

THESIS

MUNICH

1965

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

UNTERSUCHUNGEN ZUR IN-VITRO-BESTIMMUNG
DER SCHILDDRÜSENFUNCTION
MIT DEM "SERUM- T_3 -TEST"

Waltraut Diehl

AUS DER UNIVERSITÄTS-KINDERKLINIK
IM DR. VON HAUNER'SCHEN KINDERSPITAL
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. A. Wiskott

UNTERSUCHUNGEN ZUR IN-VITRO-BESTIMMUNG
DER SCHILDDRÜSENFUNKTION
MIT DEM "SERUM- T_3 -TEST"

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Höheren Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Waltraut Diehl
aus Krefeld

München 1965

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. D. KNORR
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. A. WISKOTT
Dekan:	Prof. Dr. R. ZENKER

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 12. 1965

ÜBERSICHT

	Seite:
I. EINLEITUNG	1
II. METHODE	
1. Vorbemerkungen	
a) SEPHADEX	10
b) Radiothybon	11
c) Meßgeräte	
α) Fraktionsteiler	12
β) Szintillationszähler	15
2. Technik der Methode (mit Experimenten)	
a) Präparation der Säule	16
b) Inkubierung des Serums	17
c) Elution	19
d) Auswertung	20
e) Regenerierung der Säule	21
f) Präparation der Glasgeräte	24
III. ERGEBNISSE	
1. Ergebnisse bei der Reproduzierbarkeit des " T_3 -Testes"	25
2. Alterung des Radiothybon	30
3. Ergebnisse und statistische Auswertung des " T_3 -Wertes" an einem Gesamtkollektiv von 66 Kindern	38
4. " T_3 -Wert" in Abhängigkeit vom Kindesalter .	45
5. Bestimmung der maximalen Proteinbindungs- kapazität für Trijodthyronin	47
6. Effekt nach oraler Trijodthyronin- (Thybon) und Thyreoidingabe auf den " T_3 -Test" . .	49
IV. DISKUSSION	51
V. ZUSAMMENFASSUNG	58
VI. LITERATURVERZEICHNIS	60



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. EINLEITUNG

Eine die gesamte Schilddrüsenfunktion umfassende Bestimmungsmethode existiert bis heute noch nicht. Alle gebräuchlichen Verfahren stellen Ausschnitte aus einem komplexen Reglermechanismus Hypophyse bzw. Hypothalamus - Schilddrüse - Hormonjod in der Peripherie dar.

Mit der Einführung von Radiojod in die Diagnostik konnten einige herkömmliche Tests wie Grundumsatz-, Serumcholesterin-, Blutjod-, Stickstoff-, Kreatinin- und Kupferbestimmung wertvoll ergänzt werden. Diese Radiojod - in - vivo- Methode hat eine relativ hohe diagnostische Treffsicherheit. Sie ist aber mit einer - wenn auch geringen - Strahlenbelastung für den Patienten verbunden, außerdem durch verschiedene thyreoidale und extrathyreoidale Faktoren beeinflusbar.

Um eine Inkorporierung des radioaktiven Stoffes zu vermeiden, entwickelten STUMPF u. GRAUL (93) die herkömmlichen in-vitro-Verfahren zur Schilddrüsenfunktionsbestimmung wie chemischer Nachweis der Blutjodfraktionen, PBI ¹²⁷, BEI ¹²⁷, Erythrocyten-Aufnahme-Test und Harzionenaustauscher (Näheres S. 5 - 9) weiter, indem sie die Gelfiltrationstechnik einführten. Bei diesem sog. " T_3 - Test" wird radioaktives Trijodthyronin in vitro, also außerhalb des Körpers, einer bestimmten Menge Serum zugesetzt und die Proteinbindung dieser radioaktiv markierten Substanz mittels Säulenchromatographie bestimmt.

Im folgenden wird über einige Untersuchungen zur Methodik des " T_3 - Testes" bei Kindern berichtet und zu seiner diagnostischen Verwertbarkeit Stellung genommen.

Das thyreotrope Hormon (TSH), das in den basophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet wird, steuert weitgehend die Bildung und Ausschüttung der Schilddrüsenhormone. Die TSH - Produktion und -Abgabe untersteht dabei den vegetativen Zentren des Hypothalamus, gesteuert

durch die Höhe des peripheren Hormonspiegels (Rückkopplungsmechanismus). Mit Hilfe von radioaktiv markiertem Jod können die Hormonsynthese, die Speicherung in der Schilddrüse, die Hormonausschüttung und der -Transport im Blut verfolgt werden.

Mit der Nahrung wird das Jod in anorganischer oder organischer Form aufgenommen und durch Dejodasen in Darmwand und Leber in die Jodidform übergeführt. Um dieses Jodid, das sich rasch auf das gesamte zirkulierende Blutvolumen und den extrazellulären Flüssigkeitsraum verteilt, konkurrieren vornehmlich Schilddrüse (Jodidphase), Niere und in geringem Maße auch die Speicheldrüsen (hierbei Reutilisation durch Magen - Darm - Passage). In der Schilddrüse wird das Jodid durch verschiedene Fermentsysteme (Jodase, Perjodase, vielleicht auch Cytochromoxydase oder ein der Xanthinoxidase nahestehendes Flavinenzym) zu elementarem Jod oxydiert und an das dem Thyreoglobulin angehörende Tyrosin oder Histidin angelagert. Tyrosin wird erst an Stellung 3, dann an Stellung 5 jodiert und unter Abspaltung eines Alaninrestes lagern sich 2 Moleküle Dijodtyrosin zu Tetrajodthyronin = Thyroxin zusammen. Bis 1950 wurde das Thyroxin (= T_4) als einziges Schilddrüsenhormon angesehen. GROSS und Mitarb. (34) fanden bei der chromatographischen Auftrennung von Rattenschilddrüsenextrakt im Autoradiogramm neben Thyroxin, Monojodtyrosin, Dijodtyrosin und Jodid (80) (84) noch 3 unbekannte Komponenten. Im Autoradiogramm von Plasmaextrakt dagegen beobachteten sie neben Thyroxin und Jodid nur "Unbekannt 1" (35) mit der gleichen papierchromatographischen Beweglichkeit wie Thyroxin im System:

n-Butanol - 2 N Essigsäure bzw. Phosphatpuffer pH 7,2
= 1. Dimension

n-Butanol - Dioxan - 2 N Ammoniumhydroxyd = 2. Dimension.
Von diesem konnte die unbekannte Komponente nur mit Hilfe von zweidimensionaler Papierchromatographie (Butanol-Ameisensäure = 1. Dim. Butanol-Dioxan Ammonium = 2. Dim.)

getrennt werden. GROSS und LEBLOND (33) fanden Thyroxin und "Unbekannt 1" auch im Gewebeautoradiogramm von Leber und Niere und in den faeces. Im Urin dagegen konnte nur Jodid nachgewiesen werden (33) (16) (62) (22) (46) bzw. ganz wenig Dijodtyrosin und Thyroxin (68).

1952 zeigten GROSS u. PITT-RIVERS (31), daß sich "Unbekannt 1" chromatographisch genau so verhielt wie synthetisches L-3:5:3-Trijodthyronin. Ein Jahr später gelang ihnen die schwierige Isolierung und Synthese aus gepooltem Extrakt großer Mengen Ochsenschilddrüsenhydrolysate (32a). Trijodthyronin (= T_3) kommt im Schilddrüsenextrakt wie im Plasma nur in sehr geringen Mengen vor (83) (81). Im Thyreoglobulin z.B. beträgt bei gewöhnlicher Jodernährung das Verhältnis Thyroxin : 3:5:3-Trijodthyronin : 3:5Dijodthyronin : 3Monojodtyrosin 6 : 1 : 8 : 4. Bei jodarmer Diät (Versuche an Rattenschilddrüsenextrakt nach intraperitonealer $^{131}\text{-J}$ Injektion) dagegen wird bei einer erhöhten $^{131}\text{-J}$ Speicherung vermehrt Thyreoglobulin und damit eine erhöhte Konzentration an Thyroxin und T_3 gefunden (6). Das Gegenteil tritt ein, wenn die Nahrung reichlich Jod enthält: der Jodeinbau in organische Verbindungen wird gehemmt. Die Thyreoglobulin- T_4 und - T_3 Konzentrationen sind erniedrigt.

Über die Tatsache, daß T_3 als Schilddrüsenhormon ebenso wichtig ist wie das T_4 , ist man sich heute einig. Über die T_3 - Biosynthese jedoch besteht noch viel Unklarheit.

GROSS u. Mitarb. (32b) betrachten das T_4 als Vorläufer des T_3 , welches durch Dejodierung entstehen soll. Sie zeigten, daß bei thyreidektomierten Ratten nach $^{131}\text{-J}$ T_4 - Gabe radioaktives T_3 in Niere und faeces nachweisbar war. Dieses T_3 mußte aus T_4 entstanden sein, da die Tiere keine Schilddrüse mehr besaßen (33). ARONS (3) konnte nach oraler Gabe von L- und D- T_4 bei Patienten ebenfalls das Auftreten von T_3 im Urin nachweisen. Im Körper muß also ein Enzymsystem wirksam sein, das T_4 in T_3 umzuwandeln vermag.

ROCHE u. Mitarb. (81) (83) dagegen zeigten, daß nach $^{131}\text{-J}$ Injektion in der Rattenschilddrüse gleichzeitig mit dem Radiothyroxin das Radiotrijodthyronin auftritt. Sie denken an eine Kondensation von je einem Molekül L-3 Monojodtyrosin u. L-3:5 Dijodtyrosin unter Elimination eines Alaninrestes. Für diese Hypothese spricht, daß bei einem Tier bei Jodmangeldiät nach $^{131}\text{-J}$ Gabe ein prozentual größerer Anteil T_3 zu T_4 beobachtet werden kann als bei einem Tier mit ausreichendem Jodvorrat (6).

Die echten Schilddrüsenhormone, die normalerweise in das Blut abgegeben u. in der Peripherie wirksam werden, sind 3:5:3:5'-Tetrajodthyronin = Thyroxin und 3:5:3'-Trijodthyronin (82). Sie liegen in der Schilddrüse überwiegend als Jodthyreoglobulinkomplex vor u. werden nach Bedarf durch eine Proteinase von diesem abgespalten und in den Blutkreislauf sezerniert (= Thyroxinphase, da T_4 etwa $\frac{3}{4}$ der Jodhormone im Plasma ausmacht. (84)

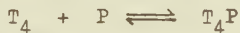
Jodidphase und Thyroxinphase können mit dem Konversionsindex studiert werden. Dabei wird nach einer $^{131}\text{-J}$ Applikation der Serumradiojodgehalt nach 2 Std. (als Ausdruck der Jodavidität) und nach 48 Std. (als Ausdruck der Thyroxinsekretion) bestimmt. (41)

Der Schilddrüsenfunktionstest, der heute diagnostisch die größte Bedeutung hat, ist der Radiojodspeicherungstest. Er gibt Auskunft über die Speicheringfähigkeit der Schilddrüse und gestattet genaueren Einblick in die anorganische (= Jodaufnahme) und organische Phase (= Hormonjodabgabe) des Jodstoffwechsels als der Konversionsindex. Die Patienten erhalten morgens nüchtern eine Spürdosis $^{131}\text{-J}$ von etwa $1\mu\text{Ci} / \text{kg}$, Kinder maximal $0,1\mu\text{Ci} / \text{kg}$ Körpergewicht. Nach 2, 6, 24 und 48 Stunden wird mit dem Szintillationszähler unter stets gleicher Meßgeometrie die Aktivität über der Schilddrüse gemessen. Für die Funktionsdiagnose ist nicht allein die Speicherungshöhe maßgebend, sondern vor allem auch der Kurvenverlauf. Der Normbereich der Speicherungshöhe ist geographisch unterschiedlich, in München etwa 35 - 70 %. Als weiteres

Kriterium der organischen Phase wird zusätzlich 48 Stunden nach der ^{131}I -Gabe Blut entnommen und die Aktivität im Trichloressigsäuresediment (PBI ^{131}I) oder im Butanol-extrakt (BEI ^{131}I) gemessen.

Die chemische Bestimmung der Blutjodfraktionen basiert auf folgender Reaktion: das Jod wird dabei aus seiner organischen Bindung gelöst und durch seine katalytische Wirkung z.B. auf die Reduktion von Cer-IV sulfat durch arsenige Säure (58), auf die Reduktion von Fe^{3+} in Fe^{2+} unter Anwesenheit von Ferricyanidionen durch arsenige Säure (27) oder durch Farbreaktion mit diazotierter Sulfanilsäure (101) quantitativ gemessen.

Der größte Teil der Schilddrüsenhormone liegt in proteingebundener Form vor. Das Verhältnis Thyroxin zu Trijodthyronin beträgt bei Euthyreoten im Durchschnitt 90 % T_4 zu 10 % T_3 (47). Nur ein minimaler Rest ist freies Hormon. Dieses ist abhängig von der Totalkonzentration an T_4 oder T_3 , von der Konzentration an Proteinbindungsstellen und von dem Gleichgewicht, das zwischen beiden herrscht.



T_4 = Thyroxin

P = Protein

T_4P = proteingebundenes T_4

Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt so weit auf der rechten Seite, daß nur 1/1000 T_4 vom totalen T_4 frei ist (8). Die T_4 -Bestimmung kann wegen extrem geringer Menge nur auf indirektem Wege durchgeführt werden. Zur Trennung benutzt man die Dialysetechnik mit einer Zellophanmembran (79) (78) (8) (90) (91). Das proteingebundene Hormonjod im weiteren Sinne fällt nach Zusatz von Trichloressigsäure zusammen mit den Bluteiweißkörpern als Sediment aus und wird deshalb im internationalen Sprachgebrauch als PBI 127 = protein bound iodine bezeichnet (94) (51) (4) (87). Es enthält die bekannten Schilddrüsenhormone

und wahrscheinlich auch an Eiweiß gebundenes Dijodtyrosin und Hormonmetaboliten (47). Das Hormonjod im engeren Sinne wird lediglich durch jodhaltige Thyronine, in jedem Falle also Thyroxin und Trijodthyronin, repräsentiert. Es verbleibt nach Extraktion des PBI mit n-Butanol und anschließender Elution desselben durch das Alkalireagens nach BLAU in der Alkoholfraktion und wird deshalb als BEI¹²⁷ = Butanol extractable iodine genannt (98) (55) (56) (57) (49). Bei Erwachsenen mit euthyreoter Stoffwechsellaage liegen die Normalwerte für das PBI¹²⁷ zwischen 4 und 8 γ pro 100 ccm Serum (51) (4) (49); die Normalwerte für das BEI¹²⁷ liegen im Durchschnitt um 0,4 γ % (56) bis 0,6 γ % (55) unter denen des PBI¹²⁷ mit einer wesentlich geringeren und konstanteren Variationsbreite. Die Erklärung liegt darin, daß bei der PBI¹²⁷ - Bestimmung neben T₄ und T₃ auch "pathologische" Jodhormone miterfaßt werden, d.h. solche, die keine periphere Hormonwirkung entfalten wie Thyreoglobulin, Dijodthyronin und Derivate (30). Daneben wird der PBI¹²⁷ Wert beeinflusst durch Jodapplikation als Röntgenkontrastmittel, als Pharmakon oder Tonikum (55) (87) (57) (94) (70) (39) (59) (8) (40) (23) (18), durch antithyreoidale Substanzen (63) (96), TSH Stimulierung (49), bei endogener Jodfehlverwertung (31) (87), in der Schwangerschaft (51) (56), bei Nephrosen (69) (77) (68), bei Leberstoffwechselstörungen und bei Hypalbuminämie (64).

Von allen diesen Faktoren wird das BEI¹²⁷ weniger betroffen. Eine Beeinflussung wurde bisher nur nach KJ Langzeitbehandlung (18), nach jodhaltigen Kontrastmitteln wie Biligraphin, Urographin, Teridax (40) (39) und nach Unterernährung bei Kindern (15) festgestellt. Seine Bestimmung - da T₄ und T₃ spezifisch - ist also wesentlich funktionsgerechter und wird vor allem durch vorangegangene Jodapplikation in der Beurteilung kaum gestört (57) (49) (55) (23). Die PBI¹²⁷ Bestimmung ist eine hochempfindliche, aufwendige Untersuchung. Sie ist nur an wenigen Orten möglich. Die BEI¹²⁷ Bestimmung, die noch komplizierter ist,

wird nur bei spezieller Fragestellung angeschlossen (49).

1952 konnten GORDON u. Mitarb. (28) als erste beweisen, daß das T_4 im Plasma spezifisch von einer α -Globulin-komponente gebunden wird. Sie verwandten die Papierelektrophorese mit Veronalpuffer pH 8,5 und identifizierten das oral verabreichte und biosynthetisch in das T_4 eingebaute $^{131}\text{-J}$ autoradiographisch. Bei näherer Betrachtung stellte man fest, daß das gebundene T_4 eine elektrophoretische Beweglichkeit zwischen α_1 und α_2 Globulinen (= sog. Inter- α -Fraktion) hatte (13) (72) (42). Es war an eine extrem kleine immunoelektrophoretisch noch heterogene Menge Protein gebunden (= TBG = Thyroxin bindendes Globulin, oder allgemeiner TBP = Thyroxin bindendes Protein) (95). Ein Teil des Thyroxins wandert im sog. Präalbumin (71) (44) (86) (95) (85) (2). Dabei ist die gebundene Menge abhängig von der jeweiligen Technik (Papier-, Stärkegel-, Zonenelektrophorese (17) (1) (42) (74) (86), Überwanderungselektrophorese (76) (26)), von der Ionenstärke und dem pH des jeweiligen Puffers (73). Dieses Präalbumin, das 1956 von SCHULTZE u. Mitarb. (85) isoliert wurde, enthält einen ungewöhnlich hohen Prozentsatz an Tryptophan (38). Auch das TBP ist sehr tryptophanreich. TATA (95) konnte zeigen, daß ein großer Teil des menschlichen Präalbumin als ein Komplex in der α -Globulin Zone vorliegt, welcher für die Bindung des T_4 im TBP verantwortlich ist. Das Albumin mit einer ausgedehnten Bindungskapazität ist ebenfalls zum Hormontransport befähigt. Es übernimmt weiteres Hormon, wenn das TBP abgesättigt ist (17) (26) (42) (74) (52). Die Affinität des 3:5:3' Trijodthyronin für das TBP ist etwa $1/3$ so groß wie die des T_4 (14) (94). Daraus ist ersichtlich, daß das TBP einen hohen Grad an Spezifität besitzt. Für Albumin ist diese Spezifität weitaus geringer, es bindet T_3 und T_4 gleichermaßen. Dagegen nimmt das Präalbumin in Trispuffer z.B. kein L-T_3 an, wohl aber L-T_4 (94).

Unter physiologischen Bedingungen wird der größte Teil an T_4 und T_3 vom TBP transportiert, wobei in Abhängigkeit vom jeweiligen Schilddrüsenfunktionszustand beim Euthyreoten nur 1/3 der Hormonbindungsstellen besetzt werden (1). Beim Hyperthyreoten wird etwa die Hälfte der TBP Bindungskapazität in Anspruch genommen, beim Hypothyreoten entsprechend weniger.

Auf grund dieser Kenntnis entwickelten HAMOLSKY, STEIN u. FREEDBERG eine Methode, bei der sich zeigt, daß die Aufnahme von $^{131}\text{-J } T_3$ durch Erythrocyten der Schilddrüsenfunktion weitgehend parallel verläuft (36). Nach weitgehender Absättigung der TBP-Fraktion mit endogenem Hormonjod wird dabei der "Hormonüberschuß" in einem in-vitro-Verfahren von Erythrocyten gebunden.

CRISPELL u. Mitarb. (10) (11) haben Parallelversuche mit $^{131}\text{-J } T_4$ gemacht, das aber wegen seiner stärkeren Bindungsaffinität zu den Serumproteinen eine geringere Erythrocytenaufnahme hatte. Der Test beruht auf einem chemisch physikalischen Vorgang, wobei die Erythrocyten eine reine Vehikelfunktion ausüben, unabhängig von ihrem Stoffwechsel, von der Adsorption an Mitochondrien und von der Zellatmung (11). Indirekt wird dabei die freie Bindungskapazität des TBP für $^{131}\text{-J } T_3$ bestimmt, d.h.: ist viel endogenes Hormon vorhanden (Hyperthyreose), so ist das TBP zum größten Teil abgesättigt und in der Folge der Erythrocyten $^{131}\text{-J}$ "uptake" erhöht; sind dagegen nur wenige Proteinbindungsstellen besetzt wie bei der Hypothyreose, so entspricht das einer erniedrigten $^{131}\text{-J } T_3$ Aufnahme an die Erythrocyten. Ein direkter Vergleich zwischen Erythrocytenaufnahme von $^{131}\text{-J } T_3$ und einem Hindurchwandern von T_4 durch eine Dialysemembran (Messung des freien, nicht proteingebundenen T_4) hat gezeigt, daß beide Methoden analoge Ergebnisse im Bereich der klinischen Schwankungsbreite ergeben (7). Bei der Anwendung des sog. "HAMOLSKY - Testes" ergeben sich jedoch viele Fehlermöglichkeiten wie: Korrektur auf einen einheitlichen Hämatokritwert, mehrere sorgfältige Waschungen der Erythrocyten um

störende Serumproteine und andere beeinflussende Faktoren wie z.B. CO_2 Einfluß (29) (21) auszuschalten. Zudem liegen von verschiedenen Autoren uneinheitliche Ergebnisse vor, so daß auch diese Methode nicht ideal erscheint (36) (20) (54).

Da es sich bei dem Erythrocyten-Aufnahme-Test um eine passive von der Zellfunktion unabhängige Adsorption handelt, kann auf die Erythrocyten verzichtet werden. An ihre Stelle wurden Ionenaustauscherharze gesetzt (100) (89) (43) (5) (92). Dabei wird das Patientenserum mit einer Anionenaufschwemmung versetzt, eine bestimmte Zeit mit $^{131}\text{-J T}_3$ inkubiert, die Gesamtaktivität und nach mehreren Waschungen die Restaktivität gemessen. Fehlerquellen sind in erster Linie durch die Waschvorgänge (Menge der Flüssigkeit, Temperatur usw.) gegeben.

STUMPF u. GRAUL (93) haben sich bemüht, bei ihrem " T_3 -Test" weder Erythrocyten, noch Waschungen nach der Radiotrijodthyroninzugabe zu verwenden. Die Rolle des Ionenaustauscherharzes spielt hier ein Dextran Gel (SEPHADEX) mit dem Unterschied, daß dieses gegenüber dem Harz nahezu frei von aktiven Gruppen ist. Es tritt also keine Konkurrenz zwischen Serumbindungsstellen und Ionenaustauschern um das zugefügte Hormon auf. So kann unter weitgehend physiologischen Bedingungen gearbeitet werden. Das SEPHADEX fungiert als ein "Molekülsieb", das bei der säulenchromatographischen Auftrennung die großen proteingebundenen $^{131}\text{-J T}_3$ Moleküle schneller passieren läßt als die kleinen, nicht proteingebundenen Komponenten. Es wird also bei dem " T_3 - Test" die Trijodthyroninadsorption an Serumproteine direkt gemessen. Sie soll ein Schilddrüsenfunktionsdiagnostikum in Abhängigkeit von der endogen vorhandenen Hormonmenge darstellen.

Wir untersuchten im folgenden die Technik der Methode, ihre Reproduzierbarkeit und Anwendung bei Kindern im Alter von 2 bis 14 Jahren, den Einfluß von Schilddrüsenhormonmedikation auf den " T_3 - Test" und die maximale Proteinbindungskapazität für T_3 .

II. METHODE

1. VORBEMERKUNGEN

a) SEPHADEX ⁺

SEPHADEX, das sich in den letzten Jahren besonders zu Dünnschicht- und Säulenchromatographie bewährt hat, besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk von Polysaccharidketten. Es wird durch Quervernetzung der linearen Makromoleküle von Dextran hergestellt. Seine zahlreichen Hydroxylgruppen lassen es in Wasser oder Elektrolytlösungen beträchtlich aufquellen. Das hier verwandte SEPHADEX G-25 fine in Perlform hat ein Wasseraufnahmevermögen von $2,5 \pm 0,2$ ml H₂O pro g trockenes SEPHADEX. Nach 1 bis 2 Stunden Quellzeit hat sich ein Gel mit einer Vielzahl von Poren gebildet, deren Größe vom Vernetzungsgrad abhängt. Dank seiner hydrophilen Ketten ist es frei von Ionengruppen und hat fast keinen polaren Charakter. (Aromatische Aminosäuren, zu denen ja auch das Thyroxin und Trijodthyronin gehören, gehen allerdings eine reversible Bindung mit den Gelpartikeln ein (66)). Deshalb hat es sich gut bewährt zur Auftrennung von Stoffgemischen nach dem Molekulargewicht. Die großen Moleküle sind vollkommen von der Gelphase ausgeschlossen. Sie wandern ohne Verzögerung in der interstitiellen Flüssigkeit und erscheinen zuerst im Eluat. Die kleinen Moleküle durchdringen einen mehr oder weniger großen Teil der Gelkörner. Je kleiner die Moleküle sind, desto mehr Poren sind für sie im Gel zugänglich. Sie erscheinen daher im Eluat in der Reihenfolge abnehmender Molekülgröße. Evtl. beruht die Adsorption der kleinen Partikel an das Gel auf einer Hemmungsdiffusion: d.h. die kleinen Partikel sind durch Reibung elektrostatisch aufgeladen und werden eine Zeit lang festgehalten (65).

⁺ Deutsche Pharmacia GmbH Frankfurt/M 1 Inkusstr. 11

b) Radiothybon

Das hier verwandte Radiothybon ($3\text{'J-}^{131}\text{I}$ -Trijodthyronin = $^{131}\text{-J T}_3$)⁺ hat eine spezifische Aktivität von 30 mCi pro mg Thybon, ist steril, pyrogenfrei und in Propylen-glykol : Wasser = 1 : 1 gelöst. Die physikalische Halbwertszeit von $^{131}\text{-J T}_3$ beträgt 8,2 Tage.

Eine Woche nach der Herstellung haben sich bereits 5 % nicht gebundenes $^{131}\text{-J}$ abgespalten - zudem 0 bis 5 % einer unbekannten Substanz, wahrscheinlich desaminiertes T_3 (Werte nach Aufbewahrung im Kühlschrank. Bei Zimmertemperatur steigen beide Prozentzahlen an).

Es ist darauf zu achten, daß die Ausgangsaktivitätsmenge nicht um den Faktor 10, gleichgültig mit welcher Substanz, verdünnt wird, da dann eine Ausfällung des $^{131}\text{-J T}_3$ möglich ist. Wir stellten mittels steriler physiologischer NaCl - Lösung oder Phosphatpuffer (ph 7,4) (Herstellung s.S. 16) eine 50 bis 100 fache Verdünnung her. Mit einer sterilen Tuberkulinspritze entnahmen wir jeweils eine 0,06 bis 0,2 μCi entsprechende Menge Radiothybon, wobei an jedem Tag wegen des radioaktiven Jodzerfalls eine Korrektur auf den ersten Meßtag notwendig war (sog. Abklingfaktor).

⁺ Für die Lieferungen von radioaktivem Trijodthyronin (Thybon) sind wir der Firma HOECHST zu großem Dank verpflichtet.

c) Meßgeräte

α) Fraktionsteiler.

Bei der säulenchromatographischen Auftrennung des Serum-131-J T_3 Gemisches (s.u.) benutzten wir einen vollautomatischen Fraktionsteiler "Chromatopart" (Bender u. Hobein, München). Dabei erfährt ein in waagerechter Richtung das Vorlagegläschen durchsetzendes konvergentes Lichtbündel in dem Augenblick eine Änderung, in dem es vor dem ansteigenden Flüssigkeitsmeniskus im Vorlagegläschen geschnitten wird. Lichtelektrisch gesteuert erfolgt dann eine Weiterschaltung auf das nachstfolgende Gläschen. Die Einstellung des Flüssigkeitsmeniskus ist beliebig, in unserem Falle jeweils genau die 1 ml entsprechende Höhe. Wir haben versucht, die möglichen Fehlerquellen, die durch unterschiedliche Tropfengröße entstehen könnten, mit der Mikrowaage zu ermitteln. Dazu bestimmten wir das Gewicht von 50 Röhrchen vor und nach der Füllung. (Tab.1)

Leerwert in g	nach 1 ml Füllung	d_1	$(d_1)^2$
16,28	17,19	0,91	0,8281
16,27	17,15	0,88	0,7744
16,27	17,15	0,88	0,7744
16,42	17,37	0,95	0,9025
16,37	17,35	0,98	0,9604
16,60	17,59	0,99	0,9801
16,72	17,63	0,91	0,8281
16,49	17,43	0,94	0,8836
16,39	17,34	0,95	0,9025
16,33	17,29	0,96	0,9216
16,39	17,35	0,96	0,9216
16,25	17,21	0,96	0,9216
16,41	17,37	0,96	0,9216
16,16	17,12	0,96	0,9216
16,26	17,22	0,96	0,9216
16,33	17,29	0,96	0,9216
16,50	17,46	0,96	0,9216
16,25	17,20	0,95	0,9025
16,22	17,18	0,96	0,9216
16,35	17,31	0,96	0,9216
16,40	17,37	0,97	0,9409
16,49	17,44	0,95	0,9025
16,49	17,44	0,95	0,9025
16,11	17,09	0,98	0,9604
16,54	17,52	0,98	0,9604
16,51	17,49	0,98	0,9604
16,16	17,09	0,93	0,8649
16,39	17,34	0,95	0,9025
16,39	17,34	0,95	0,9025
16,52	17,45	0,93	0,8649
16,43	17,36	0,93	0,8649
16,15	17,08	0,93	0,8649
16,16	17,10	0,94	0,8836
16,27	17,21	0,94	0,8836
16,68	17,63	0,95	0,9025
16,70	17,61	0,91	0,8281
16,46	17,36	0,90	0,8100
16,41	17,37	0,96	0,9216
16,38	17,31	0,93	0,8649
16,45	17,38	0,93	0,8649
16,46	17,38	0,92	0,8464
16,20	17,14	0,94	0,8836
16,55	17,50	0,95	0,9025
16,05	17,00	0,95	0,9025
16,37	17,33	0,96	0,9216
16,66	17,55	0,89	0,7921
16,33	17,30	0,97	0,9409
16,35	17,32	0,97	0,9409
16,44	17,41	0,97	0,9409
16,28	17,26	0,98	0,9604

Tab. 1 Zur Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung des Fraktionsteilers, gemessen am Gewicht der leeren Fraktionsglasröhrchen und nach Füllung mit 1 ml Eluat.

$$\sum d_i = 47,33$$

$$\sum d_i^2 = 44,8353$$

$$(\sum d_i)^2 = 2240,1289$$

d_i = Differenz zwischen Leerwertgewicht der Gläschen und nach 1 ml Füllung

$\bar{d}$ = arythmetisches Mittel aller Einzeldifferenzen

s = Standardabweichung vom Mittelwert d_i

N = Anzahl der Bestimmungen

Mittelwertberechnung:

$$\bar{d} = \frac{\sum d_i}{N} = \frac{47,33}{50} = 0,9466$$

Berechnung der Standardabweichung:

$$s^2 = \frac{\sum d_i^2 - \frac{(\sum d_i)^2}{N}}{N - 1}$$

$$s^2 = \frac{44,8353 - \frac{(47,33)^2}{50}}{49} = 0,0007694$$

$$s = 0,0277$$

Bei einem statistischen Vergleich zwischen dem Gewicht der leeren Röhrchen und dem der gefüllten konnten wir bei einem Kollektiv von $N = 50$ einen Mittelwert der Differenzen von

$\bar{d} = 0,9466$ bei einer Standardabweichung von

$s_d = 0,028$ und einer Varianz von $0,0007694$ ermitteln.

Die bei der Benutzung des Fraktionsteilers entstehenden Ungenauigkeiten beim Abfüllen der einzelnen 1 ml Portionen sind also so minimal, daß sie vernachlässigt werden können.

β) Szintillationszähler.

Die Auswertung der einzelnen Portionen in den Glasröhrchen wurde mit einem Szintillationszähler mit Bohrlochkristall und Bleiabschirmung (FH 488) vorgenommen.

(Empfindlichkeit: 920 Imp. / Min. / 0,001 μ Ci)

Wird eine Strahlenquelle, die eine durchschnittliche Zählrate von I Impulsen pro Min. gibt, T Min. gezählt, so beträgt der Standardfehler von ΔI

$$\Delta I = \frac{\sqrt{I \cdot T}}{T} \quad \text{Impulse / Min.} \quad (99)$$

Werden z.B. in 10 Min. 1000 Impulse pro Min. gezählt (= 10 000), so beträgt der Standardfehler $\sqrt{10\,000} = 100$ und der Variationskoeffizient = prozentuale Standardabweichung $\pm 1\%$. Bei einer Inkubation mit z.B. 0,03 μ Ci $^{131}\text{-J T}_3$ / ml Serum (= 0,1 μ Ci / 3 ml) erhalten wir bei 1 ml Serum eine Impulsausbeute von etwa 5 000 / Min.

Um auf einen Variationskoeffizienten von $\pm 1\%$ zu kommen, muß demnach die Meßzeit 2 Min. betragen, oder die zugefügte Aktivität muß entsprechend erhöht werden.

Wir inkubierten das Serum mit der 4 bis 5 fachen Thybonnmenge. Das Ergebnis bleibt dadurch unbeeinflusst, da das $^{131}\text{-J T}_3$ im Überfluß zugegeben wird, und da es nur auf die Relation zwischen Gesamtaktivität und proteingebundenem T_3 ankommt.

2. TECHNIK DER METHODE - MIT EXPERIMENTEN

a) Präparation der Säule.

2 g SEPHADEX G-25 fine läßt man in 15 bis 20 ml Phosphatpuffer ($\text{ph} = 7,4$) ein bis zwei Stunden lang quellen. Dabei hat die Quellung in einer Pufferlösung gegenüber in Wasser den Vorteil, daß nicht nachträglich zeitraubend der gewünschte ph Wert eingestellt werden muß. Die Adsorption der Trijodthyroninmoleküle an freie Serumproteinbindungsvalenzen variiert mit unterschiedlichem Ionenmilieu (73).

Herstellung des Phosphatpuffers:

Stammlösung I = primäres Natriumphosphat 0,0218 m
(2,62 g im Liter)

Stammlösung II = sekundäres Natriumphosphat 0,1134 m
(16,068 g im Liter). Mischungsverhältnis 1 : 1 mit
dem ph 7,4.

Das gequollene SEPHADEX wird in einem Guß in eine Chromatographiesäule (28 cm lang, 1 cm Durchmesser) eingebracht. Der Säulengrund wird zuvor mit wenig Glaswolle oder gereinigtem Sand ausgelegt um die Glasfritte bzw. schmale Säulenöffnung nicht mit den feinen Gelpartikeln zu verstopfen. Damit ein möglichst stabiles Netzwerk der SEPHADEX - Polysaccharidketten entsteht, muß sich das Gel blasenfrei und gleichmäßig absetzen (senkrechter Stand der Säule).

Der Hahn der Säulenöffnung bleibt so lange geschlossen, bis sich nach etwa 15 Min. das SEPHADEX abgesetzt hat. Die Gelsäule beträgt dann etwa 10 cm Höhe mit einem interstitiellen Flüssigkeitsraum von 4 ccm. Für den Trennungsvorgang selbst spielt die Gelbetthöhe (= Ausgangsmenge an trockenem SEPHADEX) keine Rolle. Es ändert sich dabei nur der zeitliche Beginn des Sammelns der 1 ml Portionen. Die Säule läßt man nun mit Hilfe eines Vorratbehälters einige Stunden mit Phosphatpuffer vorlaufen.

b) Inkubierung des Serums.

Zu 3 ml Serum werden $0,2 \mu\text{Ci}$ $^{131}\text{-J T}_3$ gegeben und in einem geschlossenen Erlenmeyer-Kolben 10 Min. bei 37°C inkubiert (= unsere Standardbedingungen). Aus meßtechnischen Gründen und um den methodischen Variationskoeffizienten möglichst unter 1 % zu halten (s.S.15), haben wir die von STUMPF u. GRAUL (93) angegebene Aktivitätsmenge von $0,06$ bis $0,1 \mu\text{Ci}$ erhöht, wobei sich die Ergebnisse innerhalb der biologischen und methodischen Schwankungsbreite nicht änderten. Bei einer Versuchsreihe mit demselben Serum unter gleichen Arbeitsbedingungen erhielten wir als Auswertung,

mit $0,2 \mu\text{Ci}$ = 97,44 %
 $0,5 \mu\text{Ci}$ = 95,19 %
 $1,0 \mu\text{Ci}$ = 97,43 %.

Wir haben für unsere Standardversuche das Serum mit $0,2 \mu\text{Ci}$ $^{131}\text{-J T}_3$ bebrütet, wobei wir je nach dem Alter des Thybon 10 000 bis 20 000 Impulse / Min. auswerteten und somit den Variationskoeffizienten teilweise bis auf $\pm 1/2$ % herabdrücken konnten.

Anstelle von Serum kann auch Plasma verwendet werden; es ist jedoch wegen möglicher Fehlerquellen durch Heparin- oder Citratzusatz weniger gut geeignet.

Eine Inkubationsdauer von 10 Minuten ist für den " T_3 -Test" ausreichend. Eine Versuchsreihe, die sich bei konstanter Temperatur und gleichen Versuchsbedingungen mit einer großen Menge Serum von 1 Minute bis über 20 Minuten Bebrütungsdauer erstreckt, zeigt bis 5 Min. einen steilen Anstieg. Mit zunehmender Zeit steigen die Werte nur noch unbedeutend an. Wie aus Abb. 1 hervorgeht, liegen die Werte bei 10 minütiger Inkubation in einem gut verwertbaren Plateau. Die Werte zeigen im einzelnen

bei 1 Minute = 75 %
 5 Min. = 79 %
 10 Min. = 80 %
 15 Min. = 82 %
 20 Min. = 83 %

STUMPF u. GRAUL (93) empfehlen in ihrer Methode 15 Min. Die entsprechenden Werte liegen bei ihnen

bei 5 Min. = 91 %	bei 15 Min. = 92 %
10 Min. = 94 %	20 Min. = 93 %

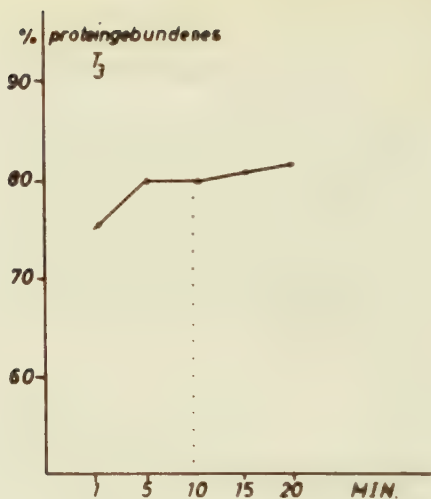


Abb. 1 " T_3 - Wert" in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

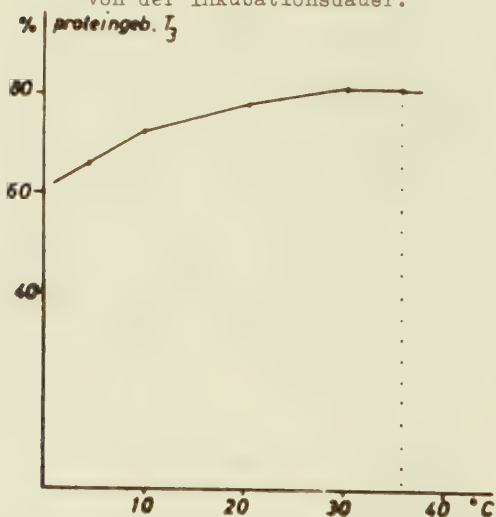


Abb. 2 " T_3 - Wert" in Abhängigkeit von der Temperatur.

Abb. 2 zeigt bei Konstanz von Serum, zugefügter Aktivitätsmenge und Bebrütungsdauer eine Versuchsreihe beginnend mit 4 Grad, dann 10, 20, 30 und 37 Grad C. Die Bindungsfähigkeit zeigt mit zunehmender Temperatur ansteigende Tendenz; d.h. im wärmeren Milieu nimmt das Hormonbindungsvermögen der Plasmaproteine für Trijodthyronin zu.

Die Werte betragen bei 4 Grad C = 66 %

10 Grad C = 73 %

20 Grad C = 78 %

30 Grad C = 81 %

37 Grad C = 82 %

c) Elution.

Vor Versuchsbeginn läßt man die Säule etwa 5 Min. vorlaufen und pipettiert die überstehende Pufferlösung ab. 1 ml des bebrüteten Serums wird nach Messung der Aktivität (=Gesamtaktivität) in die Säule einpipettiert. Wenn das Serum gerade in das Gelbett eingedrungen ist, wird vorsichtig, um die Gelpartikel nicht aufzuwirbeln, Phosphatpuffer nachgefüllt. Ist das gelbliche Serum durch die erste Hälfte der Säule gelaufen, kann mit dem Sammeln der Fraktionen zu jeweils 1 ml begonnen werden. Es werden 12 bis 14 ml gesammelt und die Impulszahl jedes gefüllten Röhrchens im Bohrloch gemessen. Die gesamte Elution kann auch mit physiologischer Kochsalzlösung erfolgen, wobei sich aber durch Inkonzanz des Ionenmilieus leicht Fehler einschleichen könnten. Einige Parallelversuche mit Phosphatpuffer- und NaCl-Elution zeigen jedoch Ergebnisse, die noch innerhalb die statistisch errechnete Schwankungsbreite der Methode (s.u.) fallen.

NaCl - Elution

Phosphatpuffer - Elution

91,18 % ----- 94,73 %

93,48 % ----- 90,29 %

77,96 % ----- 81,34 %

d) Auswertung.

Nach Messung der einzelnen 1 ml Fraktionen im Bohrlochkristall erhält man graphisch dargestellt zwei Aktivitätsgipfel, die durch ein nahezu aktivitätsfreies Intervall von 2 Röhrchen getrennt sind (Abb. 3).

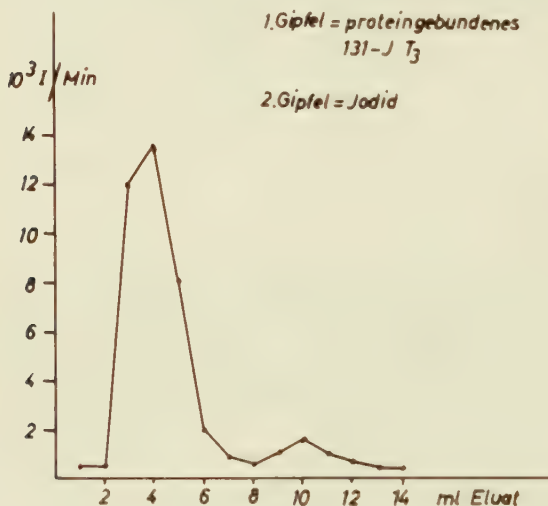


Abb. 3 SEPHADEX Gel-Filtration.

Graphische Darstellung nach Serum Inkubation mit $^{131}\text{-J T}_3$ und Impulsauswertung mit dem Bohrlochkristall FH 488.

Der 1. Gipfel stellt das proteingebundene radioaktive Trijodthyronin dar (=Makromoleküle, die bei der Gelfiltration zuerst im Eluat erscheinen). Die Höhe dieses "peaks" ist abhängig von der endogen vorhandenen Hormonjodmenge und von der zugefügten Aktivitätsmenge - die aber bei prozentualem Verhältnis zur Gesamtaktivität

keine Rolle spielt. Ist der endogene Hormonspiegel groß wie bei der Hyperthyreose, so sind nur mehr wenig Proteinbindungsstellen frei zur Aufnahme von aktivem T_3 . Der 1. Gipfel müßte kleiner werden. Sind jedoch nur wenige Proteinalenzen mit inaktivem Hormon abgesättigt wie bei der Hypothyreose, so müßte der erste Gipfel ansteigen.

Der zweite, kleinere Gipfel bezeichnet das durch radiochemische Veränderungen hervorgegangene Jodid. Für die endgültige Auswertung muß er von den Gesamtserumimpulsen abgezogen werden. Die Gesamtimpulsausbeute der zu den beiden Gipfeln gehörenden Röhren wird nun ermittelt, und die Aktivität des 1. Gipfels zu der in die Säule gegebenen Gesamtaktivität in Beziehung gesetzt:

$$\frac{\text{Impulse 1. Gipfel} \cdot 100}{\text{Gesamtserumimpulse} - \text{Impulse 2. Gipfel}} =$$

proteingebundenes $^{131}\text{-J } T_3$ in Prozent (= " T_3 - Wert").

e) Regenerierung der Säule.

Nach beendetem Trennungsvorgang ist die Säule leider nicht automatisch regeneriert, wie es bei der SEPHADEX Gel-Filtration von nicht aromatischen Aminosäuren der Fall ist. Mißt man die in dem Gel verbliebene Restaktivität, so findet man noch 7 bis 10 % der Gesamtaktivität. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um freies Trijodthyronin wie aus unseren Versuchen hervorging. Schickt man z.B. nur $0,2 \mu\text{Ci}$ Thybon in Phosphatpuffer verdünnt durch die Säule (Abb. 4) und eluiert nach etwa 16 ml mit 3 % NH_3 , so erhält man zwei der Gesamtaktivität an $^{131}\text{-J } T_3$ entsprechende Gipfel. Der erste Aktivitätsanstieg entspricht hier in seinem zeitlichen Beginn - d.h. nach etwa

8 ml Eluat - und in seiner Ausdehnung dem Jodidgipfel aus Abb. 3. Der zweite "peak" (= 3. "peak" in Abb. 5) stellt reines $^{131}\text{-J T}_3$ dar. Er steigt an mit abnehmendem 1. Proteingipfel.

STUMPF u. GRAUL nahmen zuerst irrtümlich an, daß es sich bei dem Jodidgipfel um reines T_3 handelte, da sie bis 120 ml Effluens mit Phosphatpuffer kein $^{131}\text{-J T}_3$ erhielten. Sie analysierten später jedoch quantitativ als auch mittels des RF-Wertes den 2. Gipfel (93).

Sie mußten für jeden Versuch eine neue Präparation der Shule mit SEPHADEX vornehmen.

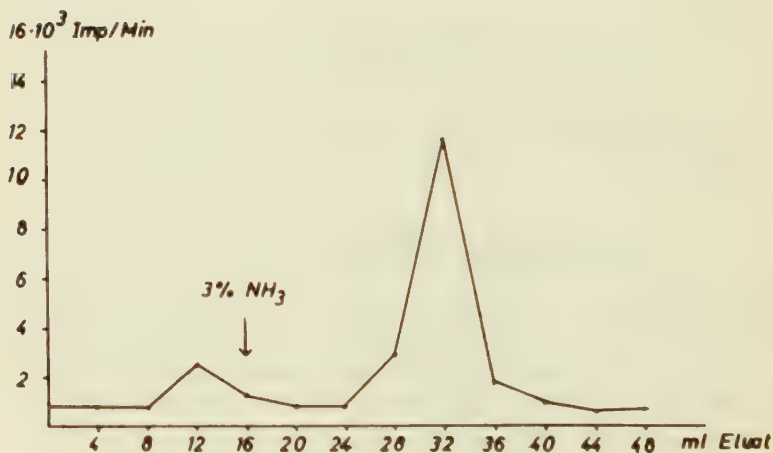


Abb. 4 Gel-Filtration mit einer $0,2 \mu\text{Ci}$ entsprechenden Menge Thyron in Phosphatpuffer, ohne Inkubation mit Serum.

Nach 16 ml Elution mit 3 % NH_3 .

1. Gipfel = Jodid

2. Gipfel = $^{131}\text{-J T}_3$

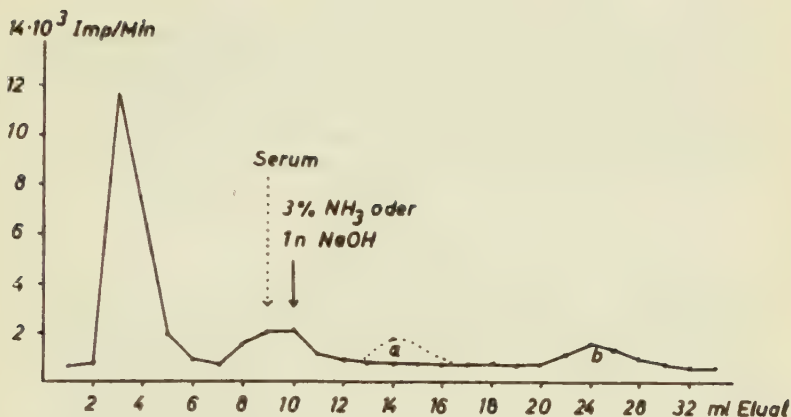


Abb. 5 Gel-Filtration mit Serum, das mit $0,2 \mu\text{Ci}$ Radiothyron inkubiert wurde. Anschließende Elution mit inaktivem Serum bzw. NH_3 bzw. NaOH . Nach Serumelution erscheint die Restaktivität schon sehr viel früher als nach NH_3 - oder NaOH -Elution.
 $\downarrow\downarrow$ = Zeitpunkt der Serum bzw. NaOH bzw. NH_3 -Zugabe.
 a = Trijodthyroninpeak bei Serumelution.
 b = Trijodthyroninpeak bei NH_3 bzw. NaOH -Elution.

Die Restaktivität kann mit verschiedenen Säuren oder Alkali ausgewaschen werden. Wir machten Elutionsversuche mit Serum, $1n \text{NaOH}$ und $3\% \text{NH}_3$ und erhielten jedesmal einen deutlichen III. Impulsanstieg. Bei Zugabe von normalem Serum zeichnet sich schon in der $13. \text{ml}$ -Fraktion ein Anstieg ab (durch große Affinität des in der Säule verbliebenen Trijodthyronin an freie Hormonbindungsvalenzen

im Serum), wohingegen die Elution mit NaOH oder NH_3 erst ab etwa 22 ml einen Aktivitätsgipfel bewirkte (Abb. 5).

In Prozenten ausgedrückt ergaben die Summe aus I., II. und III. "peak" die anfangs zugefügte Gesamtaktivität. Das Gel ist nun regeneriert und kann für weitere Versuche gebraucht werden. Es ist wichtig, daß bei mehrmaligem Gebrauch die Säule nie "trocken" steht, da sich sonst das Netzwerk der Polysaccharidketten sowie das pH Gleichgewicht verändern und den Filtrationsvorgang beeinflussen.

f) Präparation der Glasgeräte.

Sämtliche Glasgeräte (Säule, Erlenmeyer-Kolben, Pipetten, Tuberkulinspritze, Glasröhrchen etc.) wurden vor Verwendung in KJ - Lösung gelegt um eine Adsorption des radioaktiven ^{131}I - T_3 an die Glaswand möglichst gering zu halten. Trotz gründlicher Reinigung ließ sich aber die Aktivität aus den Glasröhrchen nach mehrmaligem Gebrauch nicht restlos entfernen. Das führt besonders bei niedriger Impulsausbeute im Bohrloch zu erheblichen Fehlerquellen. Bei jedem Röhrchen muß vor Versuchsbeginn der Leerwert bestimmt werden, der den sog. Nulleffekt (24) nicht wesentlich übersteigen soll. Wir führten in einem Arbeitsgang an 4 Säulen jeweils 4 Versuche bzw. 2 Doppelbestimmungen durch. Die benutzten Glasröhrchen wurden über Nacht in Dichromatschwefelsäure gelegt, die die an der Glaswand haftende Aktivität restlos tilgt.

III. E R G E B N I S S E

1. Ergebnisse bei der Reproduzierbarkeit des "T₃ - Testes".

Wir versuchten an hand von 21 Doppel-, Drei-, Vier- und Fünffachbestimmungen die Reproduzierbarkeit der vorliegenden Methode festzustellen. Dabei wurde jede Versuchsreihe in einem Arbeitsgang durchgeführt, das Serum jeweils mit $0,2 \mu\text{Ci}$ (= $0,00672 \mu\text{g}$) Thybon bei 37 Grad C 10 Min. lang inkubiert und die einzelnen Proben im Anschluß an den Trennungsvorgang ausgewertet (Tab. 2).

Zunächst wird die Standardabweichung für das Gesamtkollektiv berechnet; diese beinhaltet die methodische und die biologische Streuung. Um die biologische und die methodische Streuung zu trennen, erfolgte nach dem gleichen Rechenmodus aus den 3, 4 und 5 fach Bestimmungen die Berechnung der methodischen Abweichung, die ein $s = 2,87$ ergibt.

$T_3 A$	$T_3 A^2$	$T_3 B$	$T_3 B^2$	$= T_3 A - T_3 B$	Δ^2
86,7	7516,9	90,9	8262,8	- 4,2	17,64
84,1	7072,8	84,5	7140,3	- 0,4	0,16
76,3	5821,7	77,1	5944,4	- 0,8	0,64
71,7	5140,9	71,6	5126,6	0,1	0,01
83,0	6889,0	83,4	6955,6	- 0,4	0,16
89,4	7992,4	88,5	7832,3	0,9	0,81
89,4	7992,4	94,3	8892,5	- 4,9	24,01
89,4	7992,4	89,3	7974,5	0,1	0,01
88,5	7832,3	94,3	8892,5	- 5,8	33,64
88,5	7832,3	89,3	7974,5	- 0,8	0,64
94,3	8892,5	89,3	7974,5	5,0	25,0
92,5	8556,3	96,7	9350,9	- 4,2	17,64
91,2	8317,4	94,7	8968,1	- 3,5	12,25
95,5	9120,3	98,9	9781,2	- 3,4	11,56
93,5	8742,3	90,3	8154,1	- 3,2	10,24
89,7	8046,1	87,0	7569,0	2,7	7,29
75,5	5700,3	77,7	6037,3	- 2,2	4,84
88,6	7850,0	88,8	7885,4	- 0,2	0,04
34,3	7106,5	89,6	8028,2	- 5,3	28,09
84,3	7106,5	93,3	8704,9	- 9,0	81,00
84,3	7106,5	93,5	8742,3	- 9,2	84,64
84,3	7106,5	91,5	8372,3	- 7,2	51,84
89,6	8028,2	93,3	8742,3	- 7,7	59,29
89,6	8028,2	93,5	8742,3	- 3,9	15,21
89,6	8028,2	91,5	8372,3	- 1,9	3,61
93,3	8704,9	93,5	8742,3	- 0,2	0,04
93,3	8704,9	91,5	8372,3	1,8	3,24
93,5	8742,3	91,5	8372,3	- 2,0	4,00
93,8	8798,4	95,5	9120,3	- 1,7	2,89
90,5	8190,3	90,9	8262,8	- 0,4	0,16
90,5	8190,3	95,5	9120,3	- 5,0	25,00
90,9	8262,8	95,5	9120,3	- 4,6	21,16
90,2	8136,0	90,8	8244,6	- 0,4	0,16
78,0	6084,0	81,3	6609,7	- 3,3	10,89
94,6	8949,2	92,8	8611,8	1,8	3,24
88,8	7885,4	87,7	7691,3	1,1	1,21
96,3	9273,7	95,0	9025,0	1,3	1,69

Tab. 2 (S.26) Zur Reproduktionsberechnung des
 "T₃ - Testes" an hand von 37 Meßwertpaaren.

T₃ A = "T₃-Werte" der A Reihe ($\approx x_i$)

T₃ B = "T₃-Werte" der B Reihe

$$\sum T_3 A = 3267,3 \quad \sum^2 = 10\,675\,249,29$$

$$\sum T_3 A^2 = 289\,741,1$$

$$\sum T_3 B = 3\,334,3 \quad \sum^2 = 11\,117\,556,49$$

$$\sum T_3 B^2 = 301\,714,1$$

$$\sum \Delta = \sum T_3 A - T_3 B \text{ mit Vorzeichen} = -96,4 \quad \sum^2 = 9\,292,96$$

$$\sum \Delta = \sum T_3 A - T_3 B \text{ ohne Vorzeichen} = 110,6 \quad \sum^2 = 12\,232,36$$

$$\sum \Delta^2 = 563,94$$

Berechnung des Mittelwertes $\bar{x}$ nach der Formel:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N}$$

Berechnung der Varianz s^2 nach der Formel:

$$s^2 = \frac{\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2 / N}{N - 1}$$

Berechnung des Vertrauensintervalles nach der Formel:

$$\bar{x} \pm t \cdot \sqrt{\frac{s^2}{N}}$$

t wurde den statistischen
Tabellenwerken für die
t-Funktion entnommen. (25)

Bei der statistischen Auswertung der Meßreihe A ergibt sich ein Durchschnitt von $\bar{x}_A = 88,31$ bei einer Varianz von $s_A^2 = 33,91$ und einer Standardabweichung von $s_A = 5,82$. Bei einer gewählten Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % liegen 32 % von $N = 37$ innerhalb der absoluten Vertrauensgrenze (86,36-90,25), 40,5 % liegen oberhalb und 27,5 % unterhalb.

Die entsprechenden Werte für die Meßreihe B lauten:

$$\bar{x}_B = 90,12$$

$$s_B = 5,87$$

$$s_B^2 = 34,42$$

$$N = 37$$

$$\text{Vertrauensintervall} = 88,16 - 92,07$$

45,5 % liegen innerhalb

38,0 % liegen oberhalb

21,5 % liegen unterhalb dieses Vertrauensintervalls.

Irrtumswahrscheinlichkeit = 5 %.

Überprüft man die Varianzhomogenität der zwei Meßreihen mittels F - Test (102) (103) (= $\frac{\text{größere Varianz}}{\text{kleinere Varianz}}$

s. Berechnung Tab. 2), so erreicht das errechnete F das tabulierte F nicht; es besteht also Varianzhomogenität. errechnetes F = 1,02

tabuliertes F = 2,23 bei 1 % Irrtumswahrscheinlichkeit (=IW)

Bei einem Vergleich der beiden Reihendurchschnitte von $\bar{x}_A = 88,30$ und $\bar{x}_B = 90,12$ an hand des t - Testes (Formel:

$$t = \frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B}{\sqrt{\frac{\sum x_{1A}^2 - (\sum x_{1A})^2 / N_A + \sum x_{1B}^2 - (\sum x_{1B})^2 / N_B}{N_A + N_B - 2} \cdot \frac{N_A + N_B}{N_A \cdot N_B}}}$$

Überschreitet das errechnete t erst bei einer IW von 20 % das tabulierte t. Bei einer IW von 10 % oder gar 5 % wird der Wert des tabulierten t jedoch nicht erreicht. Somit kann bei der Reproduktion statistisch keine signifikante Differenz zwischen 1. und 2. Meßreihe gesichert werden, d.h. die Reproduktion ist - immer mit der Einschränkung, daß auf die hier vorliegende Meßreihe bezogen wird - gewährleistet.

Die Differenz der Durchschnittswerte Meßreihe A ($\bar{x}_A = 88,31$) zu Meßreihe B ($\bar{x}_B = 90,12$) beträgt 1,81; das entspricht bezogen auf $\bar{x}$ einer prozentualen Abweichung von ca. 2,6 %.

errechnetes t bei N = 37 = 1,33

tabuliertes t bei IW = 10 % = 1,67

tabuliertes t bei IW = 20 % = 1,29

2. ALTERUNG DES RADIOTHYBON

(Versuche mit 1 bis 15 Tage altem radioaktiven
Trijodthyronin)

Wir untersuchten statistisch, ob sich mit zunehmendem Alter des Thybon der 2. Gipfel signifikant ändern würde. Wir stellten dazu aus 112 Versuchen den jeweils an der Gesamtaktivität prozentual ausgedrückten 2. Gipfel in Abhängigkeit vom Thybonalter tabellarisch zusammen (Tab. 3).

Die Ergebnisse von jedem Tag wurden in Tabelle 4 in ganzzahlige Klassen eingeteilt, die den Werten des 2. "peaks" entsprechen. Tageweise geordnet ist neben jeder Klasse die Häufigkeit angegeben. Am 3. Tag wurde kein Versuch, am 11. und 13. Tag jeweils nur ein Versuch durchgeführt.

Thybonalter	Werte des 2. Gipfels in Prozent von der Gesamtaktivität ausgedrückt:									
1	6,7	9,9	6,0	8,9	10,2	15,9				
2	12,2	19,8	12,4	10,8	17,8	17,4	16,2	20,3	19,3	
4	10,9	18,6	18,7	19,2	20,6	20,2	11,3	10,5	14,1	10,0
5	12,9	15,3	10,2	9,9	10,6	16,2	15,1	15,4	11,1	12,4
	12,4	12,1	11,5	12,4	12,6	13,3				
6	15,6	11,5	15,0	15,5	16,7	14,6	13,9	10,5		
7	17,8	10,3	22,1	19,2	10,5	8,4	9,7	9,5		
8	23,3	21,4	18,8	12,4	14,2	12,2	14,5	12,2	13,2	9,9
	9,9	23,3	11,7	12,4	12,5	12,3	8,9			
9	22,0	19,8	18,6	16,1	9,6	9,7	9,9	9,2	23,7	8,6
	8,6	11,2	11,4	11,4						
10	14,9	12,4	12,2	13,6	13,0					
11	22,0									
12	17,3	13,2	26,7	14,5	20,5	13,9	24,2	16,2		
13	19,3									
14	16,5	25,5	17,3	16,2	13,5	11,8	14,4	13,1	14,0	12,0
	12,0	9,8								
15	15,0	19,1	18,9							

Tab. 3 Werte des Jodidgipfels in Abhängigkeit von zunehmendem Alter des Radiothybon. Werte tageweise geordnet aufgetragen.

Alter des Thybon in 1 Tagen:	N =	2	N =	4	N =
Klassen: 6- 7	2	10-11	1	10-11	3
7- 8		11-12		11-12	1
8- 9	1	12-13	2	12-13	
9-10	1	13-14		13-14	
10-11	1	14-15		14-15	1
11-12		15-16		15-16	
12-13		16-17	1	16-17	
13-14		17-18	2	17-18	
14-15		18-19		18-19	2
15-16	1	19-20	2	19-20	1
		20-21	1	20-21	2
$\Sigma N=6$ =====		$\Sigma N=9$ =====		$\Sigma N=10$ =====	
Alter des Thybon in 5 Tagen:	N =	6	N =	7	N =
Klassen: 9-10	1	10-11	1	8- 9	1
10-11	2	11-12	1	9-10	2
11-12	2	12-13		10-11	2
12-13	5	13-14	1	11-12	
13-14	1	14-15	1	12-13	
14-15		15-16	3	13-14	
15-16	3	16-17	1	14-15	
16-17	1			15-16	
$\Sigma N=15$ =====		$\Sigma N=8$ =====		16-17	
				17-18	1
				18-19	
				19-20	1
				20-21	
				21-22	
				22-23	1
				$\Sigma N=8$ =====	

Tab. 4 (S. 32 / 33)

Werte des Jodidgipfels aus Tab.3. Die Anzahl (N) der einzelnen Werte wurde in willkürlich gewählte gradzahlige Klassen eingeteilt. Jede Rubrik umfaßt einen Tag.

Alter des Thybon in 8 Tagen:	N =	9	N =	10	N =
Klassen: 8- 9	1	8- 9	1	12-13	2
9-10	1	9-10	4	13-14	2
10-11		10-11		14-15	1
11-12	1	11-12	3		
12-13	6	12-13		$\Sigma N=5$	
13-14	1	13-14		=====	
14-15	2	14-15		11	
15-16		15-16			
16-17		16-17	1	22-23	1
17-18		17-18			
18-19	1	18-19	1	13	
19-20		19-20	1		
20-21		20-21		19-20	1
21-22	1	21-22			
22-23		22-23	1		
23-24	2	23-24	1		
	$\Sigma N=16$		$\Sigma N=13$		
	=====		=====		

Alter des Thybon in 12 Tagen:	N =	14	N =	15	N =
Klassen: 13-14	2	9-10	1	15-16	1
14-15	1	10-11		16-17	
15-16		11-12	1	17-18	
16-17	1	12-13	1	18-19	1
17-18	1	13-14	2	19-20	1
18-19		14-15	2		
19-20		15-16		$\Sigma N=3$	
20-21	1	16-17	2	=====	
21-22		17-18	1		
22-23		18-19			
23-24		19-20			
24-25	1	20-21			
25-26		21-22			
26-27	1	22-23			
	$\Sigma N=8$	23-24			
	=====	24-25			
		25-26	1		
			$\Sigma N=11$		
			=====		

Reihe	Reihen- mittel- wert	der Mittel- werte	N der Reihe	$+\bar{x}$ Korr.	Δ^2
1	9,6	+ 4,92	6	+ 4,81	23,136
2	16,24	- 1,72	9	- 1,83	3,349
4	15,41	- 0,89	10	- 1,0	1,0
5	12,73	+ 1,79	15	+ 1,68	2,822
6	14,16	+ 0,36	8	+ 0,25	0,063
7	13,43	+ 1,09	8	+ 0,98	0,96
8	14,57	- 0,05	16	- 0,16	0,025
9	13,93	+ 0,59	13	+ 0,48	0,23
10	13,22	+ 1,30	5	+ 1,19	1,416
11	22,0	- 7,48	1	-	-
12	18,31	- 3,79	8	- 3,9	15,21
13	19,3	- 4,78	1	-	-
14	14,91	- 0,39	11	- 0,5	0,25
15	17,6	- 3,08	3	- 3,19	10,176
Kollektivmit- telwert $\bar{x}=14,52$ $+\bar{x}_{\text{Korr.}}=14,41$			$N = 114$ $+N_{\text{Korr.}} = 112$	$\sum d_i = 1,19$ $(\sum d_i)^2 = 1,416$	$\sum d_i^2 = 58,64$

Tab. 5 Zur statistischen Berechnung einer signifikanten Differenz der Werte für den Jodidgipfel mit zunehmendem Alter des 131-J T_3 .
Werte für den Jodidgipfel aus Tab. 3

$+\bar{x}$ bzw. $N_{\text{Korr.}}$ = N nach Elimination der 11. und 13. Reihe

Wir haben die Werte aus Tab. 3 statistisch auf eine signifikante Differenz mit steigendem Thybonalter hin untersucht (Tab. 5). Dabei wurde aus den Ergebnissen vom 1. bis zum 15. Tag der Kollektivmittelwert errechnet ($\bar{x} = 14,5184$) und unter Berücksichtigung der jeweiligen Reihenmittelwerte die Differenz zum $\bar{x}$ ermittelt. Da am 11. und am 13. Tag jeweils nur ein Versuch gemacht wurde, ist in der 6. Rubrik der Tab. 5 die Differenz der Reihenmittelwerte zum neu errechneten Kollektivmittelwert $\bar{x}' = 14,408$ unter Elimination dieser beiden Zahlen aufgetragen.

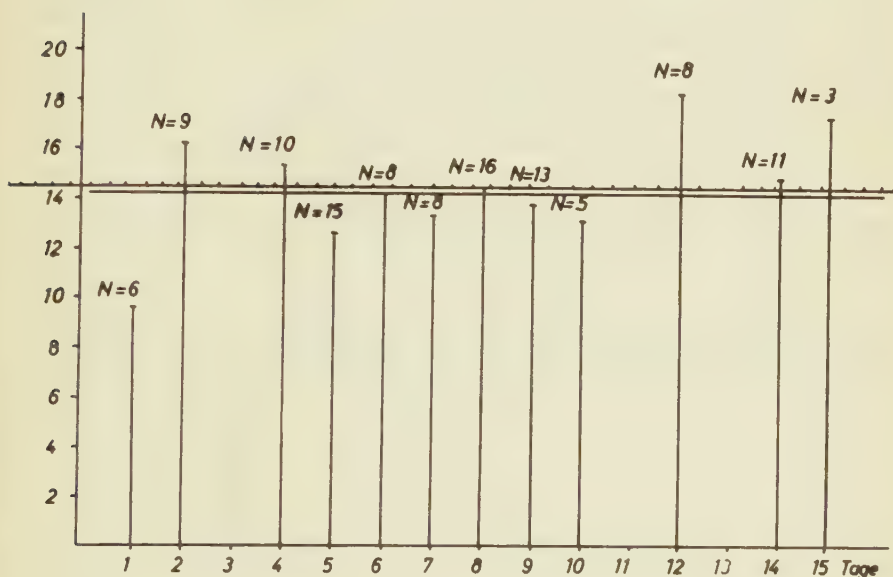


Abb. 6 Mittelwertslinien von 112 Werten (Tab. 3) des Jodidgipfels im Vergleich zum Thybonalter vom 1. bis zum 15. Tag. Abszisse: Thybonalter in Tagen
Ordinate: Reihenmittelwerte

N = Anzahl der Versuche in jeder Reihe
 - - - - = Gesamtkollektivmittelwert
 ——— = Kollektivmittelwert nach Elimination der
 11. und 13. Reihe

In Abb. 6 sind alle Reihenmittelwerte im Vergleich zum Gesamtkollektiv $\bar{x}$ und zum Kollektiv $\bar{x}'$ nach Elimination der 11. und 13. Reihe graphisch aufgezeichnet. Die Verhältnisse der $\bar{x}$ Reihenwerte zum $\bar{x}$ des Gesamtkollektivs schwanken beträchtlich und unregelmäßig. Das zeigt besonders gut die Abb. 7, wo die Abweichungen der Reihenmittelwerte vom $\bar{x}'$ nach oben und nach unten dargestellt sind. Ein linearer Abfall der Werte vom Plus- in den

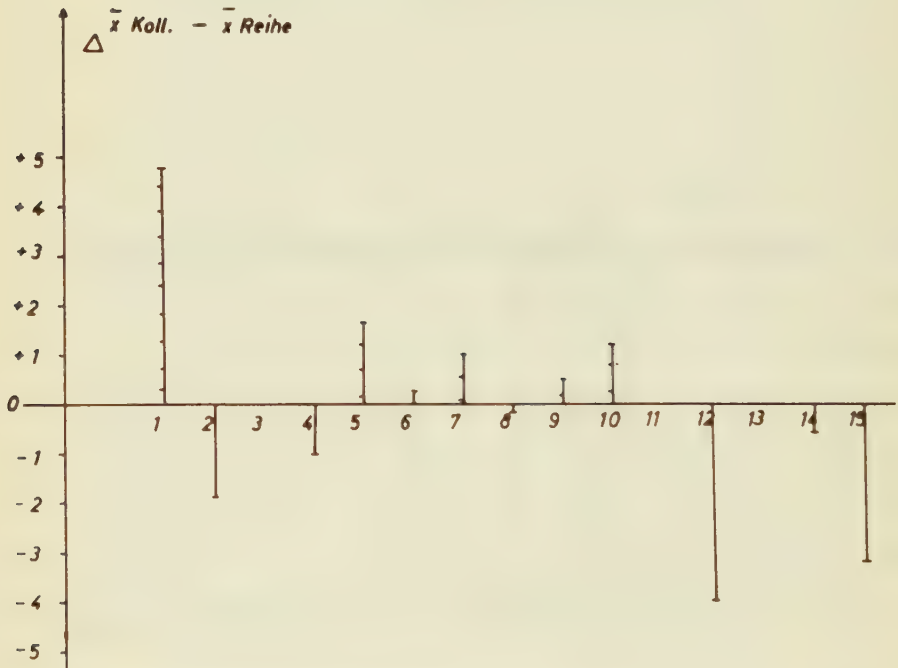


Abb. 7 Reihenmittelwerte aus 112 Werten des Jodidgipfels als Differenzen in Plus (= $\uparrow$) und Minusbereich (—) vom Kollektivmittelwert (=Nullinie) aufgetragen. Abszisse: Thybonalter in Tagen
Ordinate: Differenzen der Reihenmittelwerte zum Kollektivmittelwert.

Minusbereich mit steigendem Thybonalter läßt sich nicht verifizieren. Auch aus der statistischen Berechnung von Durchschnitt, Varianz und Standardabweichung der 12 Reihenmittelwerte vom $\bar{x}$ läßt sich keine signifikante Differenz feststellen. Es müßte eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 20 % hingenommen werden, die biologisch nicht mehr zulässig ist.

$$\bar{d} = 0,991$$

$$s^2 = 5,32$$

$$\text{errechnetes } t = 1,36$$

$$s_d = 2,3$$

was einer IW von 20 % entspricht.

$$N = 12$$

3. ERGEBNISSE UND STATISTISCHE AUSWERTUNG DES

" T_3 - TESTES" IN SEPHADEX AN EINEM GESAMTKOLLEKTIV
VON 66 KINDERN.

Der " T_3 - Test" wurde mit 66 Seren klinisch schilddrüsen-gesunder Kinder im Alter von 2 bis 14 Jahren durchgeführt. Sie befanden sich wegen anderer Krankheiten, die den Test nicht beeinflussen dürften, in stationärer Behandlung. Kinder mit Stoffwechselstörungen (Leberkrankheiten, Nephrosen, Neoplasmen, Leukämien, Polycytämien) oder Kinder, bei denen in irgendeiner Weise Jod zugeführt wurde, wurden von dem Test ausgenommen. Von jedem Patienten wurde 7 bis 8 ml Blut entnommen und nach dem Zentrifugieren erfolgte sofort die weitere Aufbereitung des Serums.

In Tab. 6 sind die jeweiligen " T_3 - Werte" aufgeführt, zudem das Alter und Geschlecht der Patienten, das Thybon-alter und die zugefügte Aktivitätsmenge an $^{131}\text{-J } T_3$.

Laufende Nr.	Alter in Jahren	Geschlecht	Alter des Thybon	Aktivität in $\mu\text{Ci}/3 \text{ ml}$ Serum	"T ₃ -Wert"	$x_1 - x_0$	$(x_1 - x_0)^2$	x_1^2
1	14	weibl.	12 Tge	0,5	86,7	- 3,3	10,89	7516,89
2	14	w.	2	0,2	90,7	0,7	0,49	8226,49
3	10	männl.	5	0,4	96,2	6,2	38,44	9254,44
4	9	m.	1	0,2	84,1	- 5,9	34,81	7072,81
5	10	m.	5	0,4	92,8	2,8	7,84	8611,84
6	11	m.	8	0,2	89,4	- 0,6	0,36	7992,36
7	13	m.	6	0,2	90,5	0,5	0,25	8190,25
8	9	m.	1	0,2	76,3	- 13,7	187,69	5821,69
9	10	m.	5	0,4	95,0	5,0	25,00	9025,00
10	9	m.	2	0,1	89,4	- 0,6	0,36	7992,36
11	6	w.	1	0,2	91,2	1,2	1,44	83 17,44
12	14	w.	12	0,5	90,9	0,9	0,81	8262,81
13	10	m.	5	0,2	82,7	- 7,3	53,29	6839,29
14	10	m.	6	0,4	86,8	- 3,2	10,24	7534,24
15	7	w.	6	0,2	84,7	- 5,3	28,09	7174,09
16	6	m.	9	0,2	92,5	2,5	6,25	8556,25
17	11	m.	9	0,2	89,3	- 0,7	0,49	7974,49
18	5	w.	5	0,2	93,8	3,8	14,44	8798,44
19	13	m.	6	0,2	90,9	0,9	0,81	8262,81
20	10	m.	7	0,4	97,2	7,2	51,84	9447,84
21	9	m.	1	0,2	84,5	- 5,5	30,25	7140,25
22	9	m.	5	0,2	83,0	- 7,0	49,00	6898,00
23	11	m.	2	0,2	92,4	2,4	5,76	8537,76
24	9	m.	5	0,2	83,4	- 6,6	43,56	6955,56

Nr.	Laufende Nr.	Alter in Jahren	Geschlecht	Alter des Thybon	Aktivität in $\mu\text{g}/3 \text{ ml}$ Serum	"T ₃ -Wert" = x_1	$x_1 - x_0$	$(x_1 - x_0)^2$	x_1^2
25		6	weibl.	8 Tge	0,2	83,0	-	49,00	6889,00
26		13	w.	9	0,2	90,6	0,6	0,36	8208,36
27		6	w.	9	0,2	89,8	-	0,04	8064,04
28		9	männl.	1	0,2	77,1	-	166,41	5944,41
29		5	w.	5	0,2	95,5	5,5	30,25	9120,25
30		11	m.	8	0,2	88,5	-	2,25	7832,25
31		8	m.	8	0,2	71,7	-	334,89	5140,89
32		8	w.	1	0,2	93,6	3,6	12,96	8760,96
33		6	m.	9	0,2	96,7	6,7	44,89	9350,89
34		6	m.	14	0,2	88,8	-	1,44	7885,44
35		11	m.	2	0,2	92,6	2,6	6,76	8574,76
36		12	m.	8	0,2	84,9	-	26,01	7208,01
37		10	m.	8	0,4	95,4	5,4	29,16	9101,16
38		6	m.	9	0,2	88,5	-	2,25	7832,25
39		14	w.	8	0,2	86,4	-	12,96	7464,96
40		9	w.	7	0,2	90,2	0,2	0,04	8136,04
41		9	w.	7	0,2	90,8	0,8	0,64	8244,64
42		5	m.	9	0,2	91,9	1,9	3,61	8445,61
43		10	m.	9	0,4	91,9	1,9	3,61	8445,61
44		10	m.	11	0,4	86,0	-	16,00	7396,00
45		11	m.	2	0,2	88,9	-	1,21	7903,21
46		11	m.	8	0,2	94,3	4,3	18,49	8892,49
47		8	m.	8	0,2	71,6	-	338,56	5126,56
48		14	w.	8	0,2	78,0	-	144,00	6084,00
49		6	m.	15	0,2	77,9	-	146,41	6068,41

Nr.	Alter in Jahren	Geschlecht	Alter des Thybon	Aktivität in $\mu\text{C}/3 \text{ ml}$ Serum	"T ₃ -Wert" $x_i - x_0$ $= x_i$	$(x_i - x_0)^2$	x_i^2
50	11	männl.	2 Tge	0,2	95,1	26,01	9044,01
51	5	m.	9	0,2	91,2	1,44	8317,44
52	10	m.	7	0,2	77,5	156,25	6006,25
53	10	m.	12	0,4	91,9	3,61	8445,61
54	2	weibl.	1	0,2	93,3	10,89	8704,89
55	2	m.	2	0,2	94,6	21,16	8949,16
56	10	m.	13	0,4	87,4	6,76	7638,76
57	10	m.	14	0,4	87,3	7,29	7621,29
58	2	m.	2	0,2	92,8	7,84	8611,84
59	11	m.	2	0,2	90,1	0,01	8118,01
60	10	m.	1	0,4	87,8	4,84	7708,84
61	10	w.	10	0,2	93,7	13,69	8779,69
62	14	w.	8	0,2	81,3	75,69	6609,69
63	6	w.	7	0,2	94,7	22,09	8968,09
64	10	m.	4	0,4	90,6	0,36	8208,36
65	10	m.	5	0,4	90,0	-	8100,00
66	13	m.	6	0,2	95,0	25,00	9025,00
					5853,3	2377,53	521380,53
					-86,7	-	-

Tab. 6 Zur Berechnung des Mittelwertes und der

Standardabweichung von 66 "T₃-Testbestimmungen"

bei euthyreoten Kindern im Alter von 2 bis 14 J.

x_i = "T₃-Wert"

x_0 = 90 (= ganze benachbarte Zahl in der Nähe von $\bar{x}$, um die Rechnung zu vereinfachen.)

$\bar{x}$ = 88,68

$$(\sum x_i - x_0)^2 = 7516,89$$

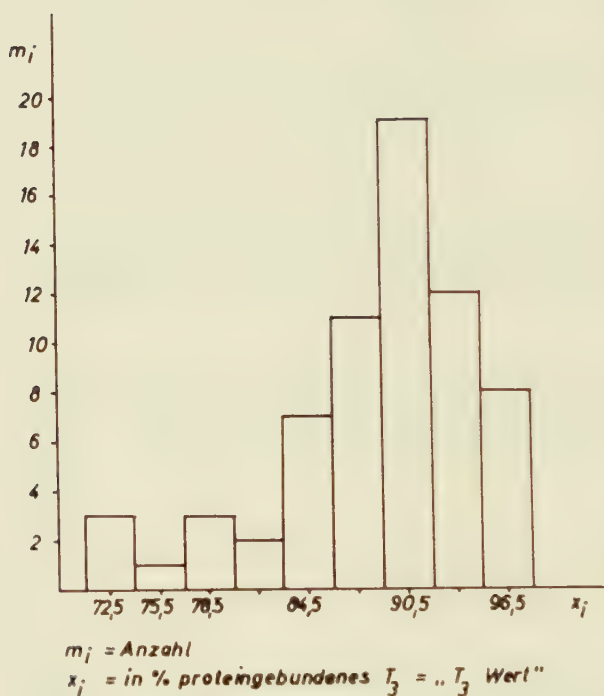


Abb. 8 Graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilung des " T_3 - Wertes" bei 66 euthyreotischen Kindern.

Abb. 8 zeigt graphisch aufgetragen die Häufigkeitsverteilung der 66 " T_3 - Testwerte" aus Tab. 6. Das Häufigkeitsmaximum liegt bei langsamem Anstieg und rapiderem Abfall

um 90 %. Die entsprechenden Werte bei euthyreotischen Erwachsenen liegen nach den Untersuchungen von STUMPF und GRAUL zwischen 75 und 86 %. (93)

Die statistische Berechnung von Durchschnitt, Varianz, Standardabweichung und Vertrauensgrenze für den unbekannten Mittelwert μ für das Gesamtkollektiv von x_1 zeigt Werte, die zwar eine Gesamtstandardabweichung von $s = 5,9$ erkennen lassen, aber insgesamt statistisch brauchbare Ergebnisse zeigt. Bei einer gewählten Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % liegen etwa 41 % der Einzelwerte innerhalb des Vertrauensintervalles (86,73 - 90,69), 34,8 % liegen über dem Vertrauensintervall und 24,2 % liegen darunter. Im einzelnen betragen die statistischen Prüfgrößen:

N = Anzahl der Meßwertpaare = 66
 n = Zahl der Freiheitsgrade = 65
 $\bar{x}$ = Durchschnitt = 88,68
 s^2 = Varianz = 34,96
 s = Standardabweichung = 5,9
Vertrauensintervall = 86,73 - 90,69

Bei der statistischen Überprüfung der Differenz zwischen x_1 und x_0 mittels "Student-Test" (24) ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied, wenn man die extremen Werte ($N = 7$) eliminiert. Für die Differenz $x_1 - x_0$ gilt:

$\bar{d}$ = Mittelwert der Differenz = 0,224
 s^2 = 15,48
 s = 3,94
 $N = 59$ $n = 58$ errechnetes $t = 0,38$ entspricht einer IW von 80 %.

Beläßt man jedoch die extrem vom Mittelwert abweichenden Werte im Kollektiv: $N = 7$

$x_i - x_o$	$(x_i - x_o)^2$
- 13,7	187,69
- 12,9	166,69
- 18,3	334,89
- 18,4	338,56
- 12,0	144,0
- 12,1	146,41
- 12,5	156,25
- 99,9	1476,21
86,7	2377,53
13,2	902,32
====	=====

so ergibt sich eine erheblich größere Varianz ($s^2 = 34,82$) bei größerem Durchschnitt der Differenz, was für eine große Schwankungsbreite der Methode spricht. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen x_i und x_o läßt sich auch hier nicht sichern. Es müßte eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 10 % hingenommen werden.

$$\bar{d} = 1,31$$

$$s^2 = 34,82$$

$$s = 5,9$$

$$N = 66$$

errechnetes $t = 1,79$ was einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 10 % entspricht bei $n = 65$

Bei zwei Kindern mit nephrotischem Syndrom betrug der "T₃ - Wert" 78,79 % bzw. 77,81 %.

4. " T_3 - WERT" IN ABHÄNGIGKEIT VOM KINDESALTER

Alter	Geschlecht	Σ der " T_3 -Werte"	$\bar{x}$	N
2 Jahre	männl.	187,4	93,7	2
	weibl.		93,3	1
5 J.	m.	183,1	91,5	2
	w.	189,3	94,6	2
6 J.	m.	443,3	88,7	5
	w.	358,7	89,7	4
7 J.	m.			
	w.		84,7	1
8 J.	m.	148,3	74,2	2
	w.		93,6	1
9 J.	m.	577,8	82,5	7
	w.	181,0	90,5	2
10 J.	m.	1435,6	89,7	16
	w.		93,3	1
11 J.	m.	820,5	91,2	9
	w.			
12 J.	m.		84,9	1
	w.			
13 J.	m.	275,4	90,8	3
	w.		90,6	1
14 J.	m.			
	w.	514,0	85,6	6

Tab. 7 " T_3 - Werte" in Abhängigkeit vom Alter und Geschlecht bei 66 euthyreoten Kindern im Alter von 2 bis 14 Jahren. Die " T_3 - Werte" wurden der Tab. 6 entnommen.

Die 66 " T_3 - Werte" (Tab. 6) von euthyreotischen Jungen und Mädchen wurden nach Alter und Geschlecht getrennt in ein Koordinatensystem eingetragen (Abb. 9). Es zeigt sich - unter Einschränkung des hier vorliegenden Kollektivs von 66 Kindern, die altersmäßig in unterschiedlicher Anzahl dem Test unterworfen wurden - weder eine eindeutige Alters- noch Geschlechtsabhängigkeit. Die Durchschnittswerte jeder Altersgruppe (Tab. 7) pendeln unregelmäßig um den Gesamtkollektivmittelwert von 88 %. Die Werte der männlichen Kinder liegen knapp unter denen der weiblichen, was aber bei N der Jungen = 47 und N der Mädchen = 19 und einer methodisch bedingter Standardabweichung von $s = 2,87$ keine weiteren Schlüsse zuläßt.

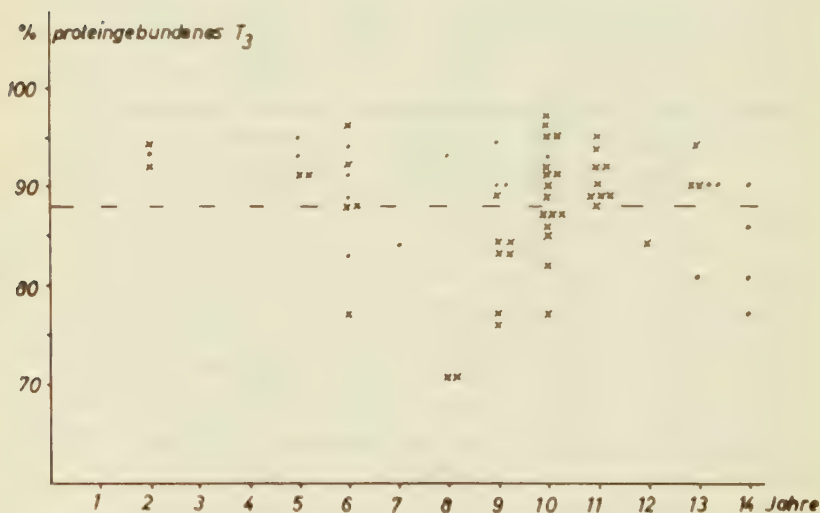


Abb. 9 Altersverteilung von 66 " T_3 - Bestimmungen" bei euthyreotischen Jungen (x) und Mädchen (o) im Alter von 2 bis 14 Jahren
 - - - = Kollektivmittelwert

5. BESTIMMUNG DER MAXIMALEN PROTEINBINDUNGSKAPAZITÄT FÜR T_3

Wir haben in 14 Einzelversuchen an einer größeren Menge Serum steigende Konzentrationen an inaktivem Trijodthyronin (gelöst in Methanol : Ammoniak = 99 : 1) zugefügt. Die Meßreihe erstreckte sich über 3 Tage, wobei folgende "Leerwerte" ermittelt wurden:

88,1 %, 85,2 % und 88,64 %.

3 ml Serum wurde 10 Min. bei 37 ° C mit 0,01 γ steigend bis 150 γ inaktivem T_3 und anschließend jeweils mit 1 μ Ci (= 0,0336 μ g) aktivem Hormon bei dergleichen Inkubationszeit und -temperatur bebrütet. (Abb. 10)

Die Werte lauten im einzelnen für

<u>inaktives T_3 / 3 ml Serum</u>	<u>"T_3 - Wert" in %</u>
0,01 γ	84,10
0,1 γ	86,18
0,5 γ	79,84
1 γ	74,63
2 γ	68,53
4 γ	60,64
5 γ	64,75
10 γ	56,11
20 γ	52,32
30 γ	49,61
40 γ	44,46
50 γ	45,94
75 γ	41,61
100 γ	33,30
150 γ	1,46

Abb. 10 veranschaulicht die Versuchsergebnisse. Nach anfänglich steilem Abfall bis 12 γ / 3 ml Serum stellt sich ein etwa linearer Verlauf absteigend bis 150 γ ein.

Aus unseren

Versuchen geht hervor, daß die Plasmaproteine bei etwa 150 γ / 3 ml Serum (= 50 γ / ml) voll mit inaktivem Hormon abgesättigt sind und kein aktives 131 -J T_3 mehr annehmen. Es ist sehr wahrscheinlich, daß sich zwischen aktivem und inaktivem T_3 ein reversibles Gleichgewicht einstellt, da anderenfalls das Serum rasch mit wenigen γ inaktiven Hormons abgesättigt sein müßte.

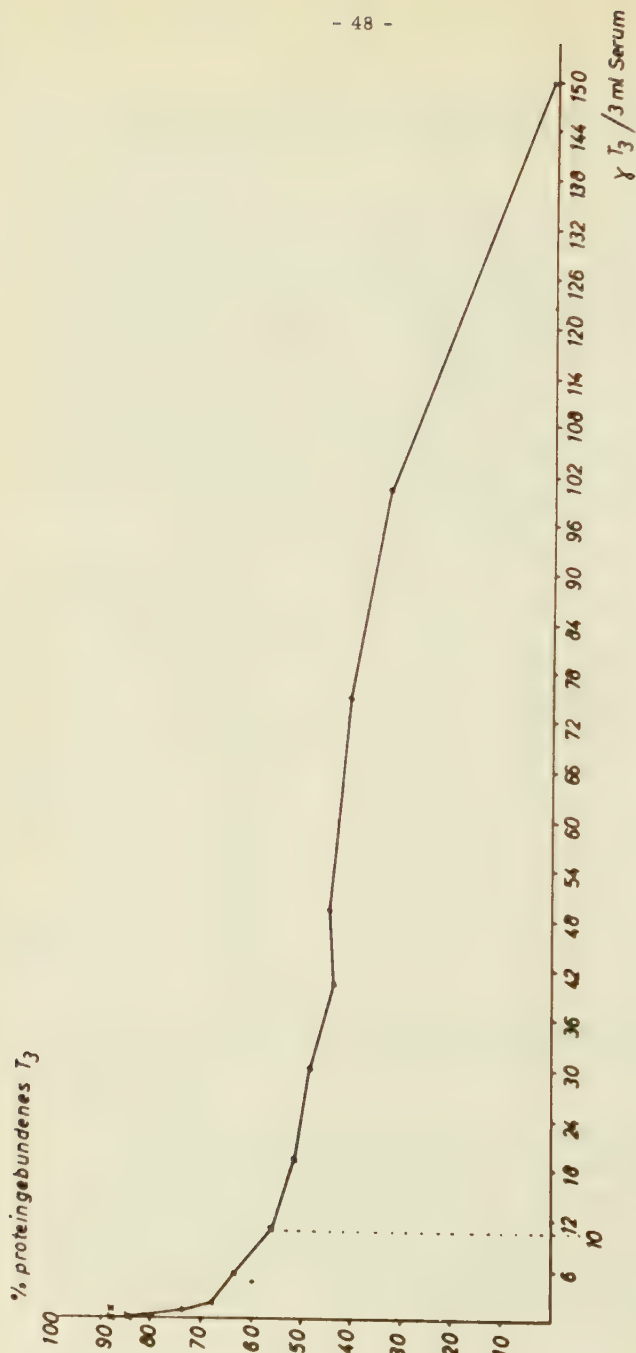


Abb. 10 Effekt auf die Protein- T_3 -Bindung nach Hinzufügen von steigenden
 Mengen inaktiven Trijodthyronins.
 Abszisse: inaktives T_3 in $\gamma / 3 \text{ ml Serum}$
 Ordinate: " T_3 -Wert"

6. EFFEKT NACH ORALER TRIJODTHYRONIN- (THYBON) UND THYREOIDINGABE AUF DEN " T_3 - TEST"

Wir untersuchten, ob eine einmalige orale Thybongabe von 100 γ auf den " T_3 -Test" einen Einfluß hat. Unser Patient war ein 12-jähriger Junge, der sich wegen eines chronischen Asthma bronchiale in stationärer Behandlung befand.

Da das Trijodthyronin eine relativ kurze biologische Halbwertszeit (s.S. 56) hat, entnahmen wir alle drei Stunden Blut, welches wir sofort säulenchromatographisch aufarbeiteten und auswerteten. Die Versuchsdauer erstreckte sich über 12 Stunden.

Einer zweiten Versuchsreihe wurde zusätzlich in-vitro jeweils 10 γ inaktives T_3 zugesetzt. Abb. 10 zeigt, daß die Sättigungskurve bei 10 γ einen steilen Verlauf einnimmt. Eine zusätzlich inaktive Hormonmenge müßte sich also schon in geringer Konzentration in einem weiteren Absinken der " T_3 -Werte" bemerkbar machen. Unser Patient war ein 11-jähriger an rheumatischem Fieber erkrankter Knabe.

Abb. 11 zeigt bei beiden Versuchsserien einen annähernd geraden Verlauf der Meßwerte. Es liegt also in den ersten 12 Stunden bei beiden Patienten keine Beeinflussung des " T_3 -Testes" durch zugeführtes Trijodthyronin vor.

Wir haben in einer dritten Versuchsreihe (Abb. 12) einen 10-jährigen Patienten wegen seiner adipositas drei Tage lang jeweils mit 100 γ Thybon und nach einer Therapiepause von 2 Tagen neun Tage lang jeweils mit 3 · 0,1 mg Thyreocidin behandelt.

Die "Nullversuche" betragen 96, 95 und 92 %. Während der Thybontherapie sinken die Werte von 97 % am ersten Tag über 95 % am 2. Tag auf 91 % am 3. Tag. Die Ergebnisse während der Thyreocidinzufuhr liegen etwa 10 % niedriger und schwanken uncharakteristisch um 87 %. Es scheint also eine, wenn auch nur geringe, Beeinflussung nach längerer Jodhormongabe vorzuliegen, wobei die Werte aber nicht signifikant vom Mittelwert abweichen.

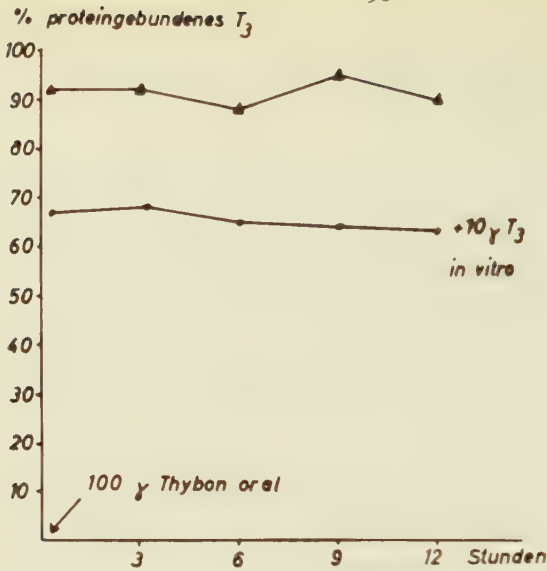


Abb. 11 Effekt nach einmaliger Thybongabe von 100 μ oral auf den " T_3 -Test".

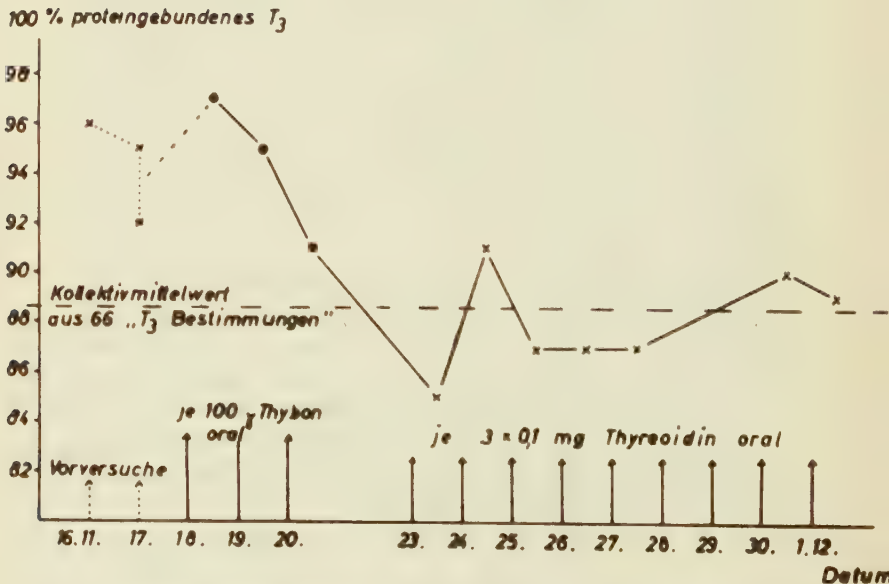


Abb. 12 Effekt nach Behandlung eines Kindes mit adipositas mit Thybon (3 Tage) und Thyreoidin (9 Tage) auf den " T_3 - Test".

IV. DISKUSSION

1) ZUR REPRODUZIERBARKEIT DER METHODE.

Die von STUMPF und GRAUL (93) entwickelte Form des " T_3 - Testes" ist nach vorliegenden Ergebnissen mit einer methodisch bedingten Standardabweichung von $s = 2,87$ belastet und reproduzierbar bei einem $\bar{x}$ von 90,37. Die benutzten Apparate wie Fraktionsteiler und Bohrlochszintillationszähler scheiden als mögliche gröbere Fehlerquellen aus wie gezeigt wurde.

2) ALTERUNG DES RADIOTHYBON.

Das Alter des radioaktiv markierten Trijodthyronin könnte sich - theoretisch betrachtet - auf den Protein- wie auch auf den Jodidgipfel auswirken.

Da jedoch die Gesamtaktivität im gleichen Maße der Alterung des Radiothybon unterliegt, und es nur auf das relative Verhältnis beider "peaks" zur gesamten Aktivität ankommt, kann das Thybonalter bis zu einem gewissen Punkt vernachlässigt werden.

Nach 14 Tagen ist durch chemischen Zerfall des $^{131}\text{-J } T_3$ bereits 8 bis 10 % einer unbekannten Substanz entstanden, wahrscheinlich desaminiertes T_3 . STRÖTTGES (92) meint daher, daß das Thybon aus diesen chemischen Gründen nur etwa 5 Tage lang verwertbar sei. Wir haben über eine Zeitspanne von 15 Tagen mit dergleichen Substanz experimentiert. Bei sorgfältiger Aufbewahrung im Kühlschrank bei $+4^\circ\text{C}$ und bei steriler Entnahme der einzelnen Portionen erhielten wir keine nennenswerten Fehlergebnisse. Möglich ist jedoch, daß diese unbekannte Substanz ebenfalls von den Plasmaproteinen transportiert wird. So könnte eine größere Menge endogen vorhandenen Hormonjods vorgetäuscht werden und den 1. "peak" kleiner werden lassen, als es dem tatsächlichen Schilddrüsenfunktionszustand entspricht. Wir haben statistisch nur den 2. Gipfel auf steigende Jodidabspaltung mit zunehmendem $^{131}\text{-J } T_3$ Alter hin

untersucht und aus 112 Versuchen keine signifikante Abweichung gefunden. Es kann sein, daß sich ein Teil des Jodids auf alle 3 "peaks" verteilt, da nach ersten Untersuchungen von HORST u. RÖSLER (42) nach in-vitro-Inkubation mit ^{131}J papierelektrophoretisch 6 % Jodid von den Albuminen und ein geringerer Teil von der Inter- α -Fraktion gebunden wird. Bei STUMPF u. GRAUL (93) betrug dieser Gipfel unabhängig vom Schilddrüsenfunktionszustand bei einem 2 Tage alten Präparat 2,8 %, bei einem 14 Tage alten Präparat 6,0 %. Die Werte liegen bei ihnen im Mittel bei 6,5 % bei einer Spanne von 2,3 bis 9,5 %. Unser Kollektivmittelwert aus 112 Versuchen von 14,4 % mit einer Standardabweichung von $s = 2,3$ (s.S. 37) liegt also in einem wesentlich höheren Bereich, zeigt aber eine ähnliche Schwankungsbreite.

3) ZU T_3 - TEST ERGEBNISSEN BEI KINDERN.

Schilddrüsenfunktionsbestimmungen ohne Inkorporierung des radioaktiven Jods ist gerade bei Kindern von vor-dringlicher Notwendigkeit. Ist die Strahlenbelastung beim Radiojodtest auch gering, so sollte grundsätzlich jede vermeidbare Strahlenexposition ausgeschaltet werden. Für Säuglinge allerdings ist wegen der schwierigen Blutentnahme der " T_3 - Test" weniger geeignet. Unser errechneter Kollektivmittelwert von 88,7 % für euthyreotische Kinder stimmt mit den Ergebnissen von CUARÓN u. Mitarb. (12) ungefähr überein, der in 97,2 % Werte von euthyreotischen Erwachsenen im Alter von 20 bis 45 Jahren zwischen 80 und 91 % erhalten hat. Die Euthyreosen haben nach den Erfahrungen von STUMPF u. GRAUL " T_3 - Werte" zwischen 75 und 86 %. In unseren Fällen liegt eine relativ hohe Streuung vom Mittelwert vor (in unseren Versuchen ist die Gesamtstandardabweichung $s = 5,9$), was sich auf relativ hohe methodisch bedingte als auch auf physiologische Schwankungsbreite verteilen dürfte. Unser " T_3 - Test" Mittelwert liegt, wenn man die Standardabweichung miteinbezieht, in einem so hohen

Bereich, daß sich die Werte für Hypothyreosen an der oberen Normgrenze unserer Euthyreosen bewegen dürften, da ja nur eine Steigerung bis 100 % möglich ist. Bei einigen von uns untersuchten hypothyreoten Kindern fanden wir Werte, die sich nur uncharakteristisch oberhalb der Euthyreosengrenze bewegten, und bei denen erst der Radiojodtest und die PBI Bestimmung die Diagnose sicherten.

Eine Athyreose dagegen hatte einen " T_3 - Wert" von 98,9 %. Um aber eine endgültige Aussage machen zu können, müßte ein größeres Patientengut untersucht werden.

Bei STUMPF u. GRAUL liegen die Hypothyreose-Werte über 86 %, bei CUARÓN u. Mitarb. oberhalb 91 %. In jedem Falle wäre es günstiger in einem niedrigeren Prozentbereich zu arbeiten um einen genügend großen Spielraum nach oben wie auch nach unten hin zu erzielen. Das könnte z.B. durch in-vitro-Zusatz einer bestimmten Menge inaktiven Trijodthyronins vor Inkubation mit aktivem Hormon geschehen um die Plasmaproteine zum geringen Teil abzusättigen. Die Standardausgangswerte lägen dann wie in Abb. 11 in einem niedrigeren Bereich. Neben zusätzlichem Arbeitsaufwand bei dem Gel-Filtrationsvorgang würde aber dabei in erhöhtem Maße eine Euproteinämie gefordert werden müssen, da ja das T_3 nicht nur von der Inter- α -Fraktion sondern bei höherer Konzentration auch vom Albumin und Präalbumin gebunden wird.

In Ermangelung von geeigneten Patienten konnten wir leider keine Hyperthyreosen untersuchen.

Zwei Kinder mit Dysproteinämie (Nephrose) zeigten Werte um 77 %, was eine gute Korrelation zum erniedrigten PBI beim nephrotischen Syndrom ergibt. Diese Patienten können trotz erniedrigten Serumproteinjods euthyreotisch sein. Bei Dysproteinämie wechselt der Thyroxin-Protein-Komplex je nach Autor und angewandter Technik von erniedrigten Werten (69) bis zu Normalwerten (77); ist qualitativ abnorm (69) bzw. vom physiologischen Standpunkt aus normal (77). Entscheidend für den euthyreoten Zustand der Patienten aber ist ein normaler Wert des freien T_4 und T_3 unabhängig vom PBI.

4) ZUM " T_3 - WERT" IN ABHÄNGIGKEIT VOM KINDESALTER.

Wir fanden bei 66 Kindern keine statistisch signifikante Differenz der " T_3 - Werte" in Abhängigkeit vom Alter. DURHAM u. Mitarb. (15) ermittelten bei 40 euthyreoten 2 Monate bis 10 Jahre alten Kindern einen durchschnittlichen BEI Wert zwischen 4,5 und 7,3 % ebenfalls ohne deutliche Altersabhängigkeit. Versuche bei Neugeborenen zeigten, daß die TBG-Hormonbindungskapazität etwa 1 1/2 mal so hoch ist wie bei normalen Erwachsenen. Die Konzentration des freien T_4 jedoch ist - wenn auch höher als bei der Mutter - im Bereich der Erwachsenenwerte (79). Das PBI ist ebenso wie die Schilddrüsen-speicherungsrate erhöht und liegt im Bereich der Hyperthyreosen (61).

MAN u. BONDY (57) stellten bei

25	4 bis 5 Tage alten Kindern einen BEI von	7,2 - 13,2 %
40	8 Wochen bis 10 Jahren alten Kindern	4,5 - 7,5 %
64	Erwachsenen von 22 bis 65 Jahren	3,5 - 6,5 %
29	Schwangeren zwischen 10. und 40. Woche	5,5 - 10,5 %

fest. MARTNER u. Mitarb. (60) dagegen erhielten bei Früh- und Neugeborenen Schilddrüsen-speicherungswerte im Bereich normaler Erwachsener und Kinder. Die Frage, ob eine Altersabhängigkeit besteht oder nicht, wird also unterschiedlich beurteilt.

Wir können auf grund unserer Versuche auch nicht sagen, ob der " T_3 - Wert" im Kindesalter höher liegt als im Erwachsenenalter, da wir den "normalen" Wert für Erwachsene nicht kennen.

5) ZUR BESTIMMUNG DER MAXIMALEN BINDUNGSKAPAZITÄT FÜR T_3 .

Wir versuchten, rein experimentell die Konzentration zu ermitteln, bei der das Serum vollständig mit inaktivem Hormon abgesättigt ist. Da ein reversibles Gleichgewicht anzunehmen ist zwischen in-vitro nacheinander inkubiertem inaktivem und aktivem T_3 (wie verschiedene Autoren bei Parallelversuchen mit endogenem und exogenem T_4 beobachteten (1) (78) (74), kann mit einem idealen und eindeutigen

Kurvenabfall in Abb. 10 nicht gerechnet werden. Es muß zudem um Normwerte aufstellen zu können, eine exakte Euproteinämie gefordert werden. Trotzdem kann der Beginn des Abfalles ab etwa 0,5 γ inaktives T_3 /3ml Serum abgelesen werden (in unserem gewählten Maßstab nicht mehr darstellbar). Die Kurve verläuft weiterhin etwas flacher um bei etwa 100 γ gegen Null abzufallen.

Nach Versuchen von FRIIS (19), der in steigenden Konzentrationen inaktive T_3 -Zugabe mit Hilfe des Erythrocyten-Aufnahme-Testes bestimmte, macht sich eine T_3 Quantität bis 0,2 μg / 3 ml überhaupt nicht bemerkbar. Nach 20 γ / 3 ml stieg der HAMOLSKY - Wert (36) um 15 % an, d.h. die Plasmabindungs kapazität für T_3 ist um 15 % reduziert.

In unseren Meßwerten macht sich eine Beeinflussung erst ab etwa 0,5 γ / 3 ml Serum wahrnehmbar, wobei der Proteingipfel abnimmt, d.h. weniger aktives $^{131}\text{-J } T_3$ gebunden wird. Für die Methode gilt, daß eine Inkubation des Serums mit 0,2 μCi (= 0,00672 μg) bis 1 μCi (= 0,0336 μg) $^{131}\text{-J } T_3$ sich nicht im Sinne eines erniedrigten " T_3 - Wertes" auswirken kann.

GILLICH (26) erhielt bis zu einem maximalen T_4 Angebot von 21,0 γ / ml keinen Anhalt für eine begrenzte T_4 Bindungskapazität des TBG. Mittels Überwanderungselektrophorese stellte es fest, daß die T_4 Bindung mit steigender T_4 Konzentration relativ abnimmt. Absolut jedoch nimmt die Bindung an Albumin und TBG zu, wobei die Albuminbindungszunahme größer ist. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch INGBAR u. Mitarbeiter (45) und ROBBINS u. Mitarb. (75), die Parallelversuche mit T_3 - und T_4 -Zugabe machten.

Die maximale Bindungskapazität des TBG für das Thyroxin liegt nach nicht ganz einheitlichen Ergebnissen, die von verschiedener Technik herrühren dürften, zwischen 0,16 bis 0,25 μg T_4 / ml (76) (1) bzw. 1,35 μg pro ml (26). Bei der 2 bis 3fach endogen vorhandenen Thyroxinmenge ist normalerweise die Absättigung des TBG erreicht (74).

6) ZUR THYBON- UND THYREOIDIN VORMEDIKATION.

Vom Trijodthyronin ist bekannt, daß es schon nach wenigen Stunden einen therapeutischen Effekt ausübt wie Anstieg des Grundumsatzes, charakteristische Wirkungen am Herzwesen (50) evtl. Puls- und Temperaturschwankungen (9). Seine biologische Halbwertszeit beträgt 1 bis 2 Tage (16) (67), wohingegen sich die des Thyroxins auf 6 bis 8 Tage beläuft (88). Vom Trijodthyronin wird vermutet, daß es wegen seiner höheren Stoffwechselwirkung (damit verbundene raschere Degradationsrate) das eigentlich wirksame Hormon darstellt. Nach T_3 - Zugabe kommt es zu einer verminderten Ausschüttung von thyreotropem Hormon der Hypophyse und in der Folge zu einer Ruhigstellung der Schilddrüse (48). So wären die niedrigen PBI-, HAMOLSKY- (54) und entsprechend hohen unbeeinflussten " T_3 - Werte" (Abb. 11/12) während der Thybon Therapie zu erklären. Das bedeutet, daß die T_3 -Applikation mit anderen Verfahren wie z.B. Grundumsatz- und Serumcholesterinbestimmung kontrolliert werden muß. Nach T_4 Gabe steigt im allgemeinen langsam das PBI an, was wahrscheinlich auf seiner im Gegensatz zum T_3 viermal geringeren biologischen Aktivität und damit verzögerten Degradationsrate beruht. FRIIS (19) fand ab einer bestimmten Konzentration T_4 (0,1 - 0,2 μ g / 3 ml Serum) ebenfalls einen erhöhten Erythrocyten-Aufnahmewert. Bei der Harzionenaustauschermethode (89) dagegen zeigt sich keine Beeinflussung durch organische Jodmedikation.

Aus unseren Versuchen können wir zwar auf einen geringen " T_3 - Wert" Abfall - durch Hormontherapie bedingt - schließen, er liegt aber nicht signifikant unter unserem errechneten Kollektivmittelwert von 88 %. Es ist also anzunehmen, daß sich in niedrigem Konzentrationsbereich eine T_3 Applikation nicht auf den " T_3 - Test" auswirkt. Warum allerdings nach Thyroxingabe der " T_3 - Wert" nicht absinkt, ist unklar.

Allgemein können wir zum " T_3 - Test" sagen, daß er eine relativ große Schwankungsbreite im Bereich der Euthyreosen aufweist, und daß er, solange keine exakten Grenzen für Hypothyreosen und Hyperthyreosen festliegen, die herkömmlichen Verfahren wie Radiojodspeicherungstest und PBI Bestimmung nicht ersetzen kann.

Da willkürlich das Verhalten von Trijodthyronin im Plasma und nicht das des praktisch stets überwiegenden Partners Thyroxin untersucht und beurteilt wird, muß in einem konstanten System - unabhängig vom Schilddrüsenfunktionszustand - gearbeitet werden. Dieses System ist aber theoretisch betrachtet leicht beeinflußbar durch Dysproteinämie, durch Änderungen des pH-Wertes (z.B. CO_2 - Retention (37)), durch hormonverdrängende Substanzen oder durch die Proteinbindungskapazität beeinflussende Prämedikation. In all diesen Fällen ist eine in-vitro-Untersuchung mit $^{131}\text{-J } T_3$ unangebracht.

Wir können auf grund unserer Versuche nur sagen, daß weder T_4 - oder T_3 - Prämedikation, noch eine Alterung oder Menge des radioaktiven Jods innerhalb einer bestimmten Variationsbreite den " T_3 - Test" beeinflussen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Der von STUMPF u. GRAUL entwickelte "Serum - T_3 - Test" beruht auf der direkten Bestimmung von im Überschuß zugefügten radioaktiven Trijodthyronin (T_3), das die restlichen Bindungswerten des Thyroxin-bindenden-Globulins (TBG) je nach der Menge endogen vorhandenen Thyroxins besetzt. Bei der Hyperthyreose wird wenig, bei der Hypothyreose viel $^{131}\text{-J } T_3$ an Serumproteine gebunden. Durch SEPHADEX Gel-Filtration und anschließender Auswertung der Fraktionen im Bohrlochszintillationszähler werden die Impulse des proteingebundenen Aktivitätsgipfels ermittelt und prozentual zur Ausgangsaktivität ausgedrückt. (= " T_3 - Wert"). Ein 2. kleinerer Gipfel bezeichnet das durch radiochemischen Zerfall des $^{131}\text{-J } T_3$ hervorgegangene Jodid.

Mit steigender Temperatur (von 4° bis 37°C) nimmt die T_3 -Bindungsaffinität zum TBG zu. Ebenso erhöht sich der " T_3 - Wert" mit zunehmender Inkubationsdauer (von 1 bis 20 Min.) des Serums mit aktivem T_3 . Die Gel-Filtrations-säule kann mit Serum, verschiedenen Säuren oder Basen von haftender Restaktivität (freies $^{131}\text{-J } T_3$) für einen neuen Versuch regeneriert werden.

Der " T_3 - Test" ist auf Grund von 21 Doppel- Drei- bis Fünffachbestimmungen mit einer methodischen Standardabweichung von $s = 2,87$ bei einer Gesamtabweichung von $s = 5,9$ belastet. Wir untersuchten, ob sich mit zunehmendem Alter des Radiothyron (vom 1. bis zum 15. Tag) die Höhe des 2. Gipfels ändert. Aus 112 Versuchen ergab sich keine statistisch signifikante Abweichung der Tageswerte vom Kollektivmittelwert.

Bei 66 euthyreoten Kindern im Alter von 2 bis 14 Jahren beträgt der " T_3 - Wert" nach statistischer Auswertung der Ergebnisse $88,68\%$ mit einer Gesamtstandardabweichung von 5,9. Die Seren der oben untersuchten Altersgruppen verhielten sich im " T_3 - Test" etwa gleich.

Der Versuch, die maximale Bindungsfähigkeit des Serums für T_3 festzustellen, brachte nur ein unsicheres Ergebnis. Dafür dürften Austauschvorgänge zwischen aktivem und inaktivem $^{131}\text{-J } T_3$ an den Hormonbindungsstellen verantwortlich sein. Die gefundenen Werte liegen jedoch in der gleichen Größenordnung wie bei anderen Autoren, die untereinander in ihren Angaben differieren. Therapeutische T_3 - oder T_4 -Prämedikation in üblicher Dosierung stören den " T_3 - Test" nicht.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Albright, E. C., F. C. Larson and W. P. Deiss:
Thyroxine Binding Capacity of Serum Alpha
Globulin in Hypothyroid, Euthyroid and
Hyperthyroid Subjects.
J. Clin. Invest. 34 : 44 (1955)
2. Aly, F. W. and K. H. Niederhellmann:
Untersuchungen zum Präalbumin im menschlichen
Serum.
Klin. Wschr. (1958) 954
3. Arons, W. L.:
Metabolism of Levo- and Dextroisomers of
Thyroid Hormones in Man.
J. Clin. Invest. 41 : 1342 (1962)
4. Barker, S. B., H. J. Humphrey and M. H. Soley:
The Clinical Determination of Protein Bound
Iodine.
J. Clin. Invest. 30 : 55 (1951)
5. Börner, W., W. Hohbach, E. Moll und K. Kaffarnik:
Der J^{131} - Trijodthyronin - in - vitro Test
in der Schilddrüsendiagnostik.
Med. Welt 15 : 832 (1964)
6. Bois, J., and L. G. Larson:
Effect of Varying Iodine Supply on Labelled
Iodine Fractions in the Thyroid Gland after
 J^{131} Administration.
Acta Endocr. 28 : 262 (1958)
7. Christensen, L. K.:
Triiodothyronine Uptake by the Erythrocytes.
Endocrinology 66 : 138 (1960)
8. Christensen, K.:
Thyroxine-releasing Effect of Salicylate and
of 2, 4 - Dinitrophenol.

9. Christensen, K.:
The Binding of L - Triiodothyronine to
Plasma Proteins.
Acta Endocr. 33 : 293 (1960)
10. Crispell, K. R. and J. Coleman:
A Study of the Relative Binding Capacity of
Plasma Proteins, Intact Human Red Cells and
Human Red Cell Stroma for Radioactive J-131
Labelled L-Thyroxine.
J. Clin. Invest. 35 : 475 (1956)
11. Crispell, K. R., Sh. Kahana and H. Heyer:
The Effect of Plasma on the in Vitro Uptake
or Binding by Human Red Cells of Radioac-
tive J-131 Labelled L-Thyroxine and L-Tri-
iodothyronine.
J. Clin. Invest. 35 : 121 (1956)
12. Cuarón, A. and M. E. Fucogauchi:
The Binding of ¹³¹J-Triiodothyronine by
Serum Proteins as an in Vitro Test of
Thyroid Function.
Acta Endocr. 46 : 161 (1964)
13. Deiss, W. P., E. C. Albright, F. C. Larson:
A Study of the Nature in Euthyroid and
Hyperthyroid Subjects by Use of Paper
Electrophoresis.
J Clin. Invest. 13 : 1000 (1952)
14. Deiss, W. P., E. C. Albright and F. C. Larson:
Comparison of in vitro Serum Protein Binding
of Thyroxine and Triiodothyronine.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 84 : 513 (1953)
15. Durham, J. R., R. E. Crooke, J. W. Lancaster and E.B. Man:
Serum Butanol Extractable Iodine Values of
Children under ten Years of Age.
Am J. Dis. Child. 87 : 468 (1954)

16. Ehrenfeld, E. N. and J. Gross:
Studies on the Metabolism of J^{131} Labelled
Triiodothyronine in the Human.
Acta Endocr. Suppl. 51 : 612 (1960)
17. Freinkel, N., J. T. Dowling and S. H. Ingbar:
The Interaction of Thyroxine with Plasma
Proteins:
Localisation of Thyroxine-Binding Protein
in Cohn Fraction of Plasma.
J. Clin. Invest. 34 : 1698 (1955)
18. Frey, H.:
Hypofunction of the Thyroid Gland, Due to
Prolonged and Excessive Intake of Potassium
Iodide.
Acta Endocr. 47 : 105 (1964)
19. Friis, Th.:
On the Mechanism of the in Vitro Uptake of
 ^{131}J Labelled L-Triiodothyronine by Human
Erythrocytes.
Acta Endocr. 33 : 134 (19607)
20. Friis, Th.:
In Vitro Uptake of ^{131}J Labelled L-Triiodo-
thyronine by Human Erythrocytes.
Acta Endocr. 33 : 117 (1960)
21. Friis, Th.:
The Effect of Prednison on the Thyroid
Function with Spezial Reference to the in
Vitro Uptake by Erythrocytes of L-Tri-
iodothyronine Labelled with ^{131}J .
Acta Endocr. 42 : 1 (1963)
22. Friis, Th.:
Thyroxine Metabolism in Man estimated by
Means of J^{131} Labelled L-Thyroxine.
Acta Endocr. 29 : 587 (1958)

23. Frischauf, H., N. Honetz, H. Jessere, R. Kotzaurek
und N. Stefenelli:
Vergleichende Untersuchungen über die diagno-
stische Brauchbarkeit einiger häufig geübter
Schilddrüsenfunktionsteste.
Dtsch. Arch. klin. Med. 207 : 329 (1961)
24. Gebelein, H. und H. J. Heite:
Statistische Urteilsbildung
Berlin 1951
25. Geigy: Wissenschaftliche Tabellen
Auflage 1962
26. Gillich, H. H.:
Quantitative Bestimmung der Bindung von
 ^{131}J Thyroxin durch Serumweißkörper mit
der Überwanderungselektrophorese.
Ztschr. ges. exper. Med. 130 : 415 (1958)
27. Gmelin, R. and Virtanen A. J.:
A Sensitive Colour Reaction for the Paper
Chromatographie Detection of Iodide, Iodinated
Tyrosines and Thyronines.
Acta chem. Scand. 13 : 1469 (1959)
28. Gordon, A. H., J. Gross, D. O'Connor and R. Pitt-Rivers:
Nature of the Circulating Thyroid Hormone-
Plasma Protein Complex.
Nature 169 : 19 (1952)
29. Graul, E. H. und W. Stumpf:
Schilddrüsenfunktionsdiagnostik mit Radiojod
ohne Inkorporierung des Radionuklids.
Dtsch. Med. Wschr. 39 : 1886 (1963)
30. Gribetz, D., N. B. Talbot and J. D. Crawford:
Goiter Due to Lymphocytic Thyroiditis
(Hashimoto's Struma).
New England J. Med. 250 : 555 (1954)

31. Gross, J. and R. Pitt-Rivers:
The Identification of 3,5,3'-L-Triiodothyro-
nine in Human Plasma.
Lancet 262 : 349 (1952)
32. Gross, J. and R. Pitt-Rivers:
Isolation from Thyroid Gland and Isolation.
Biochem. J. a) 53 : 645 (1953)
b) 53 : 652 (1953)
33. Gross, J. and C. P. Leblond:
Metabolites of Thyroxine.
Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 76 : 686 (1951)
34. Gross, J., C. P. Leblond, A. E. Franklin and
J. H. Quastel:
Presence of Iodinated Amino Acids in
Unhydrolyzed Thyroid and Plasma.
Science 111 : 605 (1950)
35. Gross, J. and C. P. Leblond:
The Presence of Free Iodinated Compounds in
the Thyroid and their Passage into the
Circulation.
Endocrinology 48 : 714 (1951)
36. Hamolsky, M. W., Stein, M. and A. St. Freedberg:
The Thyroid Hormone Plasma Protein Complex
in Man. A New in Vitro Method for Study of
"Uptake" of Labelled Hormonal Compounds by
Human Erythrocytes.
J. Clin. Endocr. 17 : 33 (1957)
37. Hamolsky, M. W. and Stein M.:
Effects of P_{CO_2} and ph on the Plasma Binding,
Turnover and Tissue Uptake of Thyroid Hormones.
J. Clin. Invest. 40 : 1047 (1961)
38. Hitzig, W. W.:
Die Plasmaproteine in der klinischen Medizin.
Springer Verlag 1963

39. Honetz, N. and R. Kotzaurek:

Über jahrelange Beobachtungen von Fällen mit
rund tausendfach erhöhtem Serumjodspiegel.
Wiener klin. Wschr. 74 : 814 (1962)

40. Honetz, N. and R. Kotzaurek:

Jodspiegeluntersuchungen im Serum nach Gabe
von - (3 - dimethyl-aminomethylenamino-
2,4,6 - trijodphenyl) propionsaures Calcium.
Fortschr. Röntg. 101 : 302 (1964)

41. Horst, W.:

Methoden und Ergebnisse des Radiojodstoffwech-
selstudiums zur Diagnose thyreoidaler und
extrathyreoidaler Erkrankungen.
Klin. Wschr. 30 : 439 (1952)

42. Horst, W. und H. Rösler:

Der Transport des Hormonjods im menschlichen
Serum untersucht mit Papierelektrophorese und
Radiojod (^{131}J).
Klin. Wschr. 31 : 13 (1953)

43. Horster, F. A. und E. Klein:

Die Anwendung von radioaktivem Trijodthyronin
zur Diagnostik der Schilddrüsenfunktion *in vitro*.
Dtsch. Med. Wschr. 89 : 983 (1964)

44. Ingbar, S. H.:

Prealbumin, a New Thyroxine-Binding Protein of
Human Plasma: Its Isolation and Physiologic
Activity in Normal and Abnormal States.
J. Clin. Invest. 37 : 903 (1958)

45. Ingbar, S. H. and N. Freinkel:

Regulation of the Peripheral Metabolism of the
Thyroid Hormones.
Recent Progr. Horm. Res. 16 : 353 (1960)

46. Kassenaar, A., L. D. F. Lameyer and A. Querido:

Studies on the Peripheral Disappearance of
Thyroid Hormone.
Acta Endocr. 32 : 575 (1959)

47. Klein, E.:
Der endogene Jodhaushalt des Menschen und seine Störungen.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1960)
48. Klein, E.:
Schilddrüsenfunktion und Stoffwechsel.
Der Internist 8 : 22 (1963)
49. Kotzaurek, R.:
Die Butanolextraktion als Ergänzung zur Jodbestimmungsmethode nach SPITZY, REESE und SKRUBE.
Klin. Wschr. 38 : 995 (1960)
50. Kuschinsky, G. und H. Wüllmann:
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1964)
51. Kydd, D. M., E. B. Man and J. P. Peters:
Concentration of Precipitable Iodine in the Serum.
J. Clin. Invest. 29 : 1033 (1950)
52. Larson, F., W. P. Deiss and E. C. Albright:
Localisation of Protein-Bound Radioactive Iodine by Filter Paper Electrophoresis.
Science 115 : 626 (1952)
53. Larson, F. C. and E. C. Albright:
The Specificity of Thyroxine Binding by Serum Alpha Globulin.
Endocrinology 56 : 737 (1955)
54. Loew, H. H.:
Untersuchungen über die J^{131} -Trijodthyronin - Aufnahme der Erythrocyten in vitro und deren Beeinflussung durch die Hypothyreosetherapie mit Trijodthyronin (Thybon) und Schilddrüsenextrakt (Thyreoidin).
Diss. München (1963)
55. Man, E. B., D. M. Kydd and J. P. Peters:
Butanol-Extractable Iodine of Serum.
J. Clin. Invest. 30 : 531 (1951)

56. Man, E. B., D. E. Pickering, J. Walker and R. E. Crooke:
Butanol-Extractable Iodine in the Serum of Infants.
Pediatrics 9 : 32 (1952)
57. Man, E. B. and P. K. Bondy:
Clinical Significance of Serum Butanol-Extractable
Iodine.
J. Clin. Endocr. 17 : 1373 (1957)
58. Mandl, R. H. and R. Block:
Methods for the Qualitative, Semiquantitative and
Quantitative Determination of Iodoamino Acids
and of Inorganic Iodide in Iodoprotein Digests
and in Human Serum.
Arch. Biochem. Biophys. 81 : 25 (1959)
59. Martin, M. M. and R. D. Rento:
Iodide Goiter with Hypothyroidism in 2 Newborn
Infants.
J. Pediat. 61 : 94 (1962)
60. Martmer, E. E., K. E. Corrigan, H. P. Charbeneau and
A. Sosin:
A Study of the Uptake of Iodine (J^{131}) by the
Thyroid of Premature Infants.
Pediatrics 17 : 503 (1956)
61. Middlesworth, L. van:
Radioactive Iodine Uptake of Normal Newborn Infants.
Am. J. Dis. Child. 88 : 439 (1954)
62. Müller, C. und G. Poretti:
Erste Versuche mit ^{131}J -Thyroxin in Reinsubstanz
(Depot) am Menschen.
Acta Endocr. 31 : 457 (1959)
63. Nilsson, L. R. and E. Berne:
The Perchlorate Test in Juvenile Auto-Immune
Thyroiditis.
Acta Endocr. 47 : 133 (1964)

64. Peters, J. P. and E. H. Man:
The Relation of Albumin to Precipitable Iodine
of Serum.
J. Clin. Invest. 31 : 789 (1948)
65. Porath, J. and P. Flodin:
Gel Filtration: A Method for Desalting and
Group Separation.
Nature 183 : 1657 (1959)
66. Porath, J.:
Gel Filtration of Proteins, Peptides and Amino Acids.
Biochem. Biophys. Acta 39 : 193 (1960)
67. Rall, J. E., J. Robbins, Becker D. and R. W. Rawson:
The Metabolism of Labeled L-Triiodothyronine.
J. Clin. Invest. 32 : 596 (1953)
68. Rasmussen, H.:
Thyroxine Metabolism in the Nephrotic Syndrome.
J. Clin. Invest. 35 : 792 (1956)
69. Recant, L. and D. S. Riggs:
Thyroid Function in Nephrosis.
J. Clin. Invest. 31 : 789 (1952)
70. Rey, E. del and G. M. de Escobar:
Studies on the Peripheral Disappearance of
Thyroid Hormone.
Acta Endocrin. 29 : 161 (1958)
71. Rich, C., and A.G. Bearn:
Localisation of the Thyroxine-Binding Protein of
Serum by Starch Gel Electrophoresis.
Endocrinology 62 : 687 (1958)
72. Robbins, J. and J. E. Rall:
Zone Electrophoresis in Filter Paper of Serum
J¹³¹ After Radiiodide Administration.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 81 : 530 (1952)
73. Robbins, J., M. L. Petermann and J. E. Rall:
Electrophoresis of the Thyroxine-Binding Protein
of Serum at pH 4.5.
J. Biol. Chem. 212 : 403 (1955)

74. Robbins, J. and J. E. Rall:
Thyroxine-Binding Capacity of Serum in Normal Man.
J. Clin. Invest. 34 : 1324 (1955)
75. Robbins, J. and J. E. Rall:
Effects of Triiodothyronine and Other Thyroxine Analogues on Thyroxine-Binding in Human Serum.
J. Clin. Invest. 34 : 1331 (1955)
76. Robbins, J.:
Reverse-Flow Zone Electrophoresis. A Method for Determining the Thyroxine-Binding Capacity of Serum Protein.
Arch. Biochem. 63 : 461 (1956)
77. Robbins, J., J. E. Rall and M. L. Petermann:
Thyroxine-Binding by Serum and Urine Proteins in Nephrosis. Qualitative Aspects.
J. Clin. Invest. 36 : 1333 (1957)
78. Robbins, J. and J. E. Rall:
The Interaction of Thyroid Hormones and Protein in Biological Fluids.
Recent Progr. Horm. Res. 13 : 161 (1957)
79. Robbins, J. and J. H. Nelson:
Thyroxine-Binding by Serum Proteins in Pregnancy and in Newborn.
J. Clin. Invest. 37 : 153 (1958)
80. Roche, J., M. Jutisz, S. Lissitzky et R. Michel:
Chromatographie Quantitative Des Acides Aminés Iodés Radioactifs de la Thyroglobuline Marquée.
Biochim. et Biophys. Acta 7 : 257 (1951)
81. Roche, J., S. Lissitzky et R. Michel:
Sur la Présence de la Triiodothyronine dans la Thyroglobuline et sur sa Biosynthèse.
Biochim. et Biophys. Acta 11 : 220 (1953)
82. Roche, J., R. Michel, J. Nunez et W. Wolf:
Sur deux constituants hormonaux nouveaux du corps thyroïde: la 3,3'-dijodothyronine et la 3,3', 5'-triiodothyronine.
Biochim. et Biophys. Acta 18 : 149 (1955)

83. Roche, J., R. Michel, W. Wolf et J. Nunez:
Sur deux nouveaux constituants hormonaux du corps
thyroïde, la 3,3'-diiodothyronine et la 3,3',
5'-triiodothyronine.
Biochim. et Biophys. Acta 19 : 308 (1956)
84. Roche, J., R. Michel et J. Nunez:
Sur le 3,3', 5'-Triiodothyronine (T_3) et 3,3'-
Diiodothyronine (T_2) Considérées comme Constituants
de l'Hormone Thyroïdienne Circulante.
Acta Endocr. 32 : 142 (1959)
85. Schultze, H. E., M. Schönenberger und G. Schwick:
Über ein Präalbumin des menschlichen Serums.
Biochem. Z. 328 : 267 (1956)
86. Smithies, O.:
Zone Electrophoresis in Starch Gels: Group
Variations in the Serum Proteins of Normal
Human Adults.
Biochem. J. 61 : 629 (1955)
87. Staffurth, J. S. and J. Birchall:
The Significance of the Protein Bound Radioactive
Iodine Determination in Hyperthyroidism.
Acta Endocr. 30 : 42 (1959)
88. Sterling, K., J. C. Lashof and E. Man:
Disappearance From Serum of J^{131} - Labeled
L -Thyroxine and L-Triiodothyronine in Euthyroid
Subjects.
J. Clin. Invest. 33 : 1031 (1954)
89. Sterling, K. and M. Tabachnik:
Resin Uptake of J^{131} -Triiodothyronine as a Test
of Thyroid Function.
J. Clin. Endocr. 21 : 456 (1961)
90. Sterling, K. and M. Tabachnik:
Free and Bound Thyroxine of Serum.
J. Clin. Invest. 39 : 1032 (1960)
91. Sterling, K.:
Estimation of Free Thyroxine Concentration in Serum.
J. Clin. Invest. 40 : 1083 (1961)

92. Strötges, M. W.:
Beitrag zur Diagnostik des kompensierten toxi-
schen Schilddrüsenadenoms.
Fortschr. Rö. Juli 1964
93. Stumpf, W. und E. H. Graul:
In vitro-Bestimmung der Schilddrüsenfunktion
mit dem Serum - T_3 - Test.
Med. Klin. 5 : 192 (1963)
94. Tanaka, Sh. and P. Starr:
The Binding of Thyroxine Analogues by Human Serum
Proteins.
Acta Endocr. 31 : 161 (1959)
95. Tata, J. R.:
Praealbumin as a Complex in the α Globulin
Fraction in Human Serum.
Nature 183 : 877 (1959)
96. Taurof, A., J. L. Chaikoff and D. D. Feller:
The Mechanism of Iodine Concentration by the
Thyroid Gland: Its non-organic Iodine Binding
Capacity in the normal and Propylthiouracil
treated Rat.
J. Biol. Chem. 171 : 189 (1947)
97. Thorén, A.:
The Influence of Iodide and Iodized Compounds on
the PBI and the ^{131}J Tracer Test with Special
Reference to Various Biologic States of the Thyroid
Acta Endocr. 35 : 351 (1960)
98. Trevorrow, V.:
Studies on the Nature of the Iodine in Blood.
J. Biol. Chem. 127 : 737 (1939)
99. Vetter, H. und N. Veall:
Radioisotopen-Technik in der klinischen Forschung
und Diagnostik.
Verlag Urban u. Schwarzenberg, München u. Berlin
(1960)

100. Woldring, M. G., A. Bakker and D. Doorenboos:
The Uptake of ^{131}J - triiodothyronine by Resin.
An in -Vitro Test of Thyroid Function.
Acta Endocr. 37 : 607 (1961)
101. Zyl, A. van und M. Bhaga:
A Spray Method for the Simultaneous Detection
of Iodide and Iodinated Amino Acids on Filter
Paper Chromatograms.
Nature 191 : 275 (1961)

Der experimentelle Teil vorliegender Arbeit wurde im Labor der Universitätskinderklinik und in den Isotopenlabors des Instituts für Physikalische Therapie und Röntgenologie der Universität München durchgeführt. Für diese Gelegenheit zu wissenschaftlicher Arbeit ebenso wie für die Übernahme des Coreferates danke ich Herrn Prof. Dr. A. Wiskott, dem Direktor der Universitätskinderklinik.

Herrn Priv. Doz. Dr. D. Knorr, dem Referenten dieser Arbeit, gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas zu vorliegender Dissertation.

Herrn Prof. Dr. H. v. Braunbehrens, dem Direktor des Instituts f. Physik. Therapie, Herrn Priv. Doz. Dr. Frey und seinen Assistenten danke ich herzlich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes in den Isotopenlabors, für die Benutzung der dortigen Apparate und für die wissenschaftliche Anleitung auf dem Gebiet der Isotopenforschung.

Herzlichen Dank schulde ich auch Herrn Dr. Klemm, der mich bei der statistischen Auswertung der vorliegenden Ergebnisse anleitete.

Lebenslauf.

Am 13. August 1940 kam ich, Waltraut Diehl, als Tochter des Chemikers Dr. Karl Diehl und seiner Frau, Barbara Diehl, geborene Gressert, in Krefeld auf die Welt. Mein Vater verstarb 1951 an den Folgen eines Kriegsleidens.

Ich besuchte von April 1947 ab vier Jahre lang die Volksschule in Krefeld. Danach kam ich auf das Neusprachliche Mädchengymnasium, wo ich Ostern 1960 das Abitur bestand. Im Mai 1960 begann ich in Bonn mit dem Medizinstudium. Nach vollendeter naturwissenschaftlicher Vorprüfung im März 1961 setzte ich mein Studium an der Freiburger Universität fort. 1962 legte ich dort die ärztliche Vorprüfung mit der Note "gut" ab. Im Winter 1963 studierte ich in Innsbruck, im Sommer 1964 in Wien. Danach wechselte ich an die Universität München über, wo ich am 17. 12. 1965 das medizinische Staatsexamen mit der Note "gut" bestand.

